

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND
10751123

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 14 MAY 2003
WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 22 513.3

Anmeldetag: 17. Mai 2002

Anmelder/Inhaber: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Hamburg/DE

Bezeichnung: Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-
regulierbaren Genexpression

IPC: C 12 N 15/86

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Faust

BEST AVAILABLE COPY

UEXKÜLL & STOLBERG

PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Martinistr. 52

20246 Hamburg

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBORGB VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT von HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU
DR. BERND JANSEN
DR. ALBRECHT von MENGES
DR. MARTIN NOHLEN
MÜNCHEN
DIPL.-ING. LARS MANKE
RECHTSANWALT IN HAMBURG
DR. FRANK DETTMANN

Mai 2002

(P 60239 We)

Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-regulierbaren Genexpression

Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

Bösartige Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen des Menschen. Bei fortgeschrittenen und metastasierten soliden Tumorerkrankungen sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch sehr limitiert und das 5-Jahresüberleben vieler dieser Karzinomerkrankungen beträgt weniger als 10%. Daher stellt die metastasierte

Karzinomerkrankung eine der größten Herausforderungen in der experimentellen Medizin dar. Durch Einschleusen therapeutischer Gene in Tumorzellen eröffneten gentherapeutische Ansätze neue Perspektiven in der Therapie dieser Erkrankungen.

Adenoviren ermöglichen den effizienten Transfer und die Expression therapeutischer Gene in verschiedene Gewebe und Zelllinien. Insbesondere die Weiterentwicklung rekombinanter adenoviraler Vektoren hat die experimentellen Ansätze in der adenoviralen Gentherapie maligner Erkrankungen ermöglicht (K. Kozarsky, Curr Opin Genet Dev 3 (1993) 499-503).

Mit der hohen Effizienz des Gentransfers sind gentherapeutische Ansätze heute häufig durch die Toxizität infolge unkontrollierter Transgenexpression limitiert. Insbesondere bei der adenovirale vermittelten Expression von Zytokinen wie Interleukin-2, Interleukin-12, Interleukin-18 oder Tumor Nekrose Faktor α kann es auch bei intratumoraler Gabe der rekombinanten Adenoviren zu unerwarteten erheblichen systemischen Nebenwirkungen kommen. Eine den konstitutiven Promotoren (Cytomegalovirus-Promotor) vergleichbare Genexpression nach erfolgter adenoviraler Infektion mit rekombinanten Vektoren konnte bislang nicht effizient kontrolliert werden.

Gegenwärtig stellt das von M. Gossen et al. entwickelte Tet-System eines der am meisten geeigneten Mittel zur Kontrolle der Genexpression dar (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551; M. Gossen et al. Science 268 (1995) 1766-1769). Das Tet-System basiert auf zwei Elementen des E. coli Tet-Operons. Das Tetracyclin-induzierbare Repressorprotein (tetR)

wird mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Dieses tTA Fusionsprotein interagiert mit der heptamerisierten tetO Operatorsequenz, was in der transkriptionellen Aktivierung der flankierenden minimalen Promotoren resultiert. Die Bindung von Tetracyclin und dessen Derivaten an die TetR-Domäne von tTA inhibiert die Wechselwirkung des Fusionsproteins mit dessen Operatorsequenzen, was zur Herunterregulierung der Transgen-Expression führt.

Die Verwendung des ursprünglichen tet-regulierten Genexpressionssystems in rekombinanten adenoviralen Vektoren (TC Harding et al. J. Neurochem. 69 (1997) 2620-2623; TC Harding et al. Nat. Biotechnol. 16 (1998) 553-555) brachte zwei wesentliche Hindernisse mit sich. Die limitierte Verpackungskapazität resultierte in unzureichender Aktivierung des CMV minimalen Promoters durch Verstärkungsinterferenz (S. Rubinovic et al. Gene Therapy 8 (2000) 875-885), und die konstitutionelle Transaktivator-Expression hatte eine mit VP16 zusammenhängende Toxizität zur Folge.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein für die Gentherapie von Tumorerkrankungen geeignetes Genexpressionssystem bereitzustellen, das die aus dem Stand der Technik bekannten Nachteile nicht aufweist. Insbesondere sollen (adeno-)virale Vektoren mit einem hohen Maß an Transgen-Expression bereitgestellt werden, die ferner die Möglichkeit bieten, dass diese Expression im Fall schwerwiegender Nebenwirkungen, die aus der Transgenexpression resultieren, effizient herunterreguliert

werden kann. Ferner sollen die Vektoren ein hohes Maß an Sicherheit bei der Anwendung aufweisen, insbesondere soll die aus dem Stand der Technik bekannte, mit VP16 zusammenhängende Toxizität vermieden werden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen rekombinanten viralen, insbesondere adenoviralen Vektor gelöst, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron¹ - TK⁺ - TetO, - CMV⁺ - Intron² - Transgen

aufweist, wobei

- TetO, der heptamerisierte Tetracylin-Operator ist,
TK⁺ der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,
tTA eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,
CMV⁺ der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und
Transgen eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,
Intron¹ eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und
Intron² eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

Für die Konstruktion der erfindungsgemäßen rekombinanten Adenoviren wurde das Tetracyclin induzierbare Repressor-Protein (tetR) mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Im Vordergrund steht dabei nicht mehr die Inhibition durch Bindung des tetR an das Operon, sondern die Positionierung des VP16 Transaktivators. Entsprechend wurde für die vorliegende Erfindung auch ein heptamerisiertes TetO Operon mit zwei flankierenden Minimalpromotoren verwendet. Dieses System (Fig. 1) führt zur autoregulierten Transaktivator-Expression im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus über einen der Minimalpromotoren. Gleichzeitig wird ein therapeutisches Transgen über den anderen flankierenden Minimalpromoter exprimiert. Doxycyclin und Tetracyclin binden an die tetR-Komponente und eine Änderung der sterischen Konformation führt zu einem Verlust der Bindung des tetR an den Operator. Die Dissoziation des Transaktivators von den Minimalpromotoren hat dann eine Reduktion der Genexpression zur Folge.

Mit den erfindungsgemäßen Vektoren wurde erstmals ein replikationsdefizientes adenovirales System auf Basis eines Vektors erzeugt und charakterisiert, bei dem eine autoregulierte Transaktivator-Expression erfolgt. Dieses System ermöglicht eine sehr strenge Kontrolle der Transgen-Expression durch Zugabe von Doxycyclin in nicht-toxischen Konzentrationen. Die hohe Suppression der Genexpression wurde über einen weiten m.o.i.-Bereich (multiplicity of infection) und in verschiedenen Karzinomzelllinien erreicht.

Der Anteil der Suppression hängt von der verwendeten Konzentration des Antibiotikums ab. Da eine maximale

Suppression der Transgenexpression bereits bei Doxycyclin-Konzentrationen von 2 µg/ml erzielt wurden, sind die erfundungsgemäßen Vektoren bestens zur klinischen Anwendung geeignet.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen genannten Vektor, bei dem das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist, d.h. in der Form

5'-Transgen-Intron²-CMV⁺-TetO,-TK⁺-Intron¹-tTA-3'.

Ebenso ist es möglich, daß ausschließlich oder zusätzlich die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.

Soweit die Sequenzelemente 'Intron¹' und/oder 'Intron²' vorhanden sind (d.h. > 0 bp), kann deren Länge im Bereich bis zu etwa 1000 bp unabhängig voneinander variieren und z.B. jeweils bis etwa 750, bis etwa 500 oder bis etwa 250 bp betragen. In diesem Fall werden die Promotoren üblicherweise innerhalb der jeweiligen Intronsequenz liegen.

Gemäß einer weiteren Alternative kann das Insert zwischen 'CMV⁺' und 'Intron²' oder zwischen 'Intron²' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthalten, wodurch eine weitere Regulationsmöglichkeit geschaffen wird.

Das verwendete Transgen ist eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2), Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α) oder Interferon-γ (IFN-γ) kodierende Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise single-chain Interleukin-12. Die Erfindung

betrifft ferner Vektoren, bei dem einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Genes zur Apoptose-Induktion, zur Expression des BAX Genes, zur Expression des FAS-L Genes, eines Suizid-Genes, wie Thymidin-Kinase-oder Cytosin-Deaminase-Gen, oder eines β -Galaktosidase-Genes verwendet wird.

Hinsichtlich des verwendeten Virusrückgrats eignet sich insbesondere ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus, wobei Adenoviren besonders bevorzugt sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Vektor ist das Insert in die E1-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert, alternativ eignen sich auch die E3- und/oder die E4-Region.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Vektor, der zum Beispiel durch homologe Rekombination eines viralen, insbesondere eines adenoviralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist. In diesem Zusammenhang steht "SEQ ID NO:" für die gemäß WIPO-Standard ST.25 verwendete Kennziffer <400>.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz sowie dessen Verwendung zur Herstellung eines oben genannten, erfindungsgemäßen Vektors.

Wie bereits erwähnt eignen sich die Vektoren zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien oder, wenn 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, zur Verwendung in der Gentherapie. Beispielsweise kann 'Transgen' IL-12 oder IL-18 sein, wodurch sich der Vektor zur Gentherapie maligner Erkrankungen eignet. Bei den malignen Erkrankungen handelt es sich insbesondere um einen soliden Tumor.

Bei den zuvor genannten Verwendungen wird die Genexpression mit Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivaten, insbesondere mit Doxycyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert. Soweit vorliegend Doxycyclin erwähnt ist, wird der Fachmann die Übertragbarkeit des erfindungsgemäßen Prinzips auf die oben genannten Tetracyclin-Derivate erkennen.

Weitere Vorteile der Erfindung:

Im Vergleich zu einer durch den im Stand der Technik stark verwendeten konstitutiven humanen Zytomegalivirus (HCMV) immediate-early Promotor getriebenen Expression des IL-12-Heterodimers wird bei den im Rahmen der Erfindung entwickelten Konstrukten in einer großen Zahl von Krebszelllinien eine bis zu 4000-fach höhere Zytokin-Sekretion beobachtet. Dieser unerwartete Effekt wird auf das Zusammenspiel aus der Wahl der Promotors und der Verwendung von genetisch erzeugtem und hoch-sekretorischem, einzelkettigem IL-12 zurückgeführt. Die IL-12-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin war überraschenderweise ebenfalls den zuvor bereits veröffentlichten adenovirale infizierten murinen Tumorzellen unter Verwendung des CMV-Promotors zu

Regulierung der Expression des heterodimeren oder einzelkettigen mIL-12 überlegen. Da die Transduktion humaner Tumorzellen im Vergleich zu zuvor berichteten Werten aus präklinischen oder klinischen Versuchen bei den erfindungsgemäßen Konstrukten ebenfalls signifikant höher ist, wird somit vorliegend ein weiterer, äußerst vorteilhafter Effekt erzielt. Durch die Möglichkeit, die adenovirale Dosis der erfindungsgemäßen Vektoren zu reduzieren, lassen sich nämlich Vektor-spezifische Nebeneffekte vermindern, was zu einer höheren Sicherheit in der klinischen Anwendung führt.

Im Hinblick auf die gemäß einer besonderen Ausführungsform genutzte Interleukin-12-Expression (siehe unten) haben die erfindungsgemäßen adenoviralen Vektoren ferner den Vorteil, daß sie alle Voraussetzungen zur erfolgreichen gentherapeutischen Krebsbehandlung erfüllen. So wird durch Expression des einzelkettigen Interleukin-12, das, verglichen mit der allgemein verwendeten heterodimeren Form, eine ähnliche Bioaktivität aufweist, die Bildung von inhibitorischen p40-Homodimeren verhindert, und durch die schnelle Regulation der Genexpression im erfindungsgemäßen 3r-System durch effiziente Sekretion des einzelkettigen Interleukin-12 sichergestellt. Die äußerst effiziente, Doxycyclin-vermittelte Suppression der Expression des bioaktiven, einzelkettigen Interleukin-12 trägt somit zur Sicherheit bei der gentherapeutischen Krebsbehandlung bei.

Das erfindungsgemäße System zeichnet sich ferner dadurch aus, daß eine westliche Standardernährung das sensitive tet-OFF-System nicht beeinflußt wird, so daß mögliche Belastungen der

Nahrung mit Spuren an Tetracyclin oder dessen Derivaten im klinischen Umfeld kein Problem darstellen.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren ist die Anwesenheit von Transaktivatoren vor der Infektion mit den Vektoren nicht erforderlich, wodurch die Toxizität infolge der konstitutiven Expression des Transaktivators sowie eine gegenseitige Beeinflussung oder Störung der Transkription durch Doxycyclin-abhängige, autoregulative Genexpression vermieden wird. Demzufolge stellen die adenoviralen Vektoren der vorliegenden Erfindung ein wesentlich vielseitigeres und unaufwendigeres Hilfsmittel im Vergleich zu den im Stand der Technik bekannten Modellen der konstitutiven Transaktivator-Expression dar.

Ferner ist von Vorteil, daß die Doxycyclin-regulierte Genexpression nach adenoviraler Infektion einer großen Vielzahl nativer Säugerzelllinien oder Gewebe erfolgen kann. Die Autoregulation bewirkt ferner eine Beschränkung der ungewollten Transgen-Expression durch reduzierte Transaktivator-Expression bei Suppression durch Doxycyclin. Gegenüber den im Stand der Technik beschriebenen Ansätzen bieten die erfindungsgemäßen Vektoren den Vorteil, daß in Abwesenheit von Doxycyclin eine sehr hohe Transgen-Expression erreicht wird, während die Suppression der Transgen-Expression durch die Zugabe dieses Antibiotikums nicht beeinträchtigt wird, und bis zu 6000-fache Suppressions-Level erzielt werden.

Die erfindungsgemäßen Konstrukte lassen sich somit in vorteilhafter Weise zu Expression therapeutischer Transgene von bis zu 4,8 kB, einschließlich Apoptose-induzierender

Gene, verwenden und stellen damit ein wichtiges Mittel zur molekularen Therapie maligner Erkrankungen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ferner überraschenderweise festgestellt, daß die erfindungsgemäßen Vektoren eine mindestens 40-fach höhere Sensitivität gegenüber Tetracyclin aufweisen als die Detektionsgrenze in Standard-HPLC-Verfahren. Das erfindungsgemäße System eignet sich somit ferner als sensitiveres Hilfsmittel zum Nachweis sehr geringer Tetracyclinkonzentrationen in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben und ist somit beispielsweise zum Einsatz in der human- und veterinärmedizinischen Diagnostik geeignet (vgl. N. Schultze et al. Nat. Biotechnol. 14 (1996) 499-503). Das Transgen kodiert in diesem Fall für ein Reporterprotein, wie z.B. Luciferase oder ähnliches. Gegenstand der Erfindung ist somit ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben, wie z.B. Doxycyclin, in biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

BeispieleZelllinien

HeLa und 293 humane embryonale Nierenzellen wurden in HGDMEM (Gibco, Rockville, MD) kultiviert. Humane RT-4 Blasenkrebszellen und humane Colon Adenokarzinomzellen HT29 wurden in McCoy-Medium (Gibco) gehalten. MCF-7 und BT-20 humane Brustkrebszellen sowie humane Colon (Colo 205 und SkCO-1) und pankreatische Adenokarzinom- (Aspc-1) Zelllinien ließ man in RPMI-Medium (Gibco) wachsen. HepG2 humane hepatozelluläre Karzinomzellen wurden in MEM-Medium (Gibco) gehalten. Zellen wurden kultiviert und gemäß Standardvorschriften aufgeteilt. Alle Medien waren mit 10% fötalem Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1% Glutamin (Gibco) supplementiert. Die humane Myelomzelllinie U266 ließ man in RPMI-Medium wachsen, das mit 15% FBS (Clontech) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) supplementiert war.

Beispiel 1Plasmidkonstruktion

DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese getrennt und aus der Agarose mit dem Gel extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) eluiert. DH5alpha-Zellen wurden zur Plasmidvermehrung eingesetzt. Plasmid-DNA wurde unter Verwendung eines modifizierten Protokolls für eine alkalische Lyse, gefolgt von einer Reinigung über eine kommerziell

erhältliche Ionenaustauschsäule nach Angaben des Herstellers (Qiagen), präpariert. Vor der Transfektion wurden LPS-Verunreinigungen in den Plasmid-DNA-Präparationen durch eine Triton X-117 Extraktionsmethode (M. Cotton et al., Gene therapy 1 (1994) 239-246) reduziert. Das Plasmid pBIG 3r, das das autoregulierte tTA Expressionssystem enthält, ist vorbeschrieben (C.A. Strathdee, Gene 229 (1999) 21-29). Die Luciferase cDNA wurde aus dem Plasmid pGL3basic (Promega, Madison, WI) durch BglII- und XbaI-Verdau erhalten und in pBIG 3r inseriert, das mit SpeI und BamHI gespalten wurde, was zur Erzeugung von pBIG 3r luc führte. Die adenovirale Plasmid pAd.CMV-Expressionskassette wurde durch Verdau mit XbaI und SalI nach Auffüllen mit T4 DNA-Polymerase entfernt. pBIG 3r luc wurde mit PvuII und SalI verdaut, und die Fragmente, die die bicistronische Expressionskassette enthielten, wurden in das Rückgrat von pAd.CMV-pA ligiert. Das resultierende adenovirale Plasmid pAd3r-luc enthielt die bidirektionale Expressionskassette, die an ihrem 5'-Ende durch die 1-456 bp des AD5-Genoms einschließlich Linker ITR und Verpackungssignale flankiert ist und die an ihrem 3'-Ende durch 3346-5865 bp des AD5-Genoms flankiert ist. Die von minimalen TK-Promotor getriebene Expression des tTA war antiparallel, und die durch den minimalen CMV-Promotor getriebene Expression des Luciferase-Gens war parallel zur adenoviralen E1-Transkription. Das Luciferase-Gen wurde aus pGL3-basic durch Verdau mit KpnI/SalI freigesetzt und in das adenovirale Expressionsplasmid pAd.CMV-pA ligiert, was zu pAd.CMV-luc führte. Die cDNA des einzelkettigen murinen Interleukin-12 wurde aus pSFG.IL-12.p40.L.p35 (G.J. Lieschke et al. Nat. Biotechnol. 15 (1997) 35-40) nach Verdau mit NcoI und EcoRV erhalten. Dieses Fragment wurde in den NheI/SalI-Ort von pAd.3r-luc subkloniert und ersetzte das Luciferase-

Gen. Das nachfolgend verwendete Plasmid pAd.CMV.p40.IRES.p35 enthält die zwei murinen IL-12 Untereinheiten, die durch eine Internal Ribosome Entry Site (IRES) des Enzephalomyocarditis-Virus getrennt sind. Die Expression dieses Konstrukts steht unter der Kontrolle des humanen Zytomegalovirus (CMV) Promotor-Elements von -601 bis -14 relativ zum Transkriptionsstart.

Beispiel 2

Erzeugung und Amplifikation rekombinanter adenoviraler Vektoren

Rekombinate E1- und E3-deletierte Adenoviren wurden erhalten und Plaque-gereinigt nach Kalziumphosphat-vermittelter Cotransfektion von pAd.3r-luc, pAd.CMV-luc, pAd.3r-scIL-12 oder pAd.CMV.p40.IRES.p35 mit pBHG10 (AJ Bett et al., PNAS USA 91 (1994) 8802-8806). Die E1- und E3-deletierten Adenoviren wurden in 293-Zellen repliziert und durch CsCl-Zentrifugation wie zuvor beschrieben (FL Graham, Virology 54 (1973) 536-539) gereinigt. Die Titration der gereinigten Viren wurde mittels Plaque-Assay durchgeführt. Die resultierenden Titer für Ad.3r-luc, Ad.CMV-luc, Ad.3r-scIL12 und Ad.CMV-p40.IRES.p35 waren $1,0 \times 10^{10}$ p.f.u./ml (plaque forming units pro ml), $7,5 \times 10^9$ p.f.u./ml, $6,7 \times 10^9$ p.f.u./ml und $8,0 \times 10^9$ p.f.u./ml. Virale DNA wurde erhalten (Qiagen DANN Blood Kit) zur Sequenzanalyse, um die Insertion, die Transaktivator-Sequenz und die Orientierung zu bestätigen.

Beispiel 3In vitro adenovirale Transfektion

HT29, Colo205, SkCO-1, AsPc-1, HepG2, MCF-7, BT-20, HeLa, RT4 und U266 Zellen wurden in Platten mit sechs und zwölf (U266) Kavitäten bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Kapität 6 Stunden vor der Transfektion gesät. Die größeren HeLa-, RT-4- und 293-Zellen wurden bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Kapität gesät. U266-Myelomzellen wurden in Suspensionskultur wachsen gelassen und infiziert. Gereinigte virale Partikel wurden in Medien ohne Supplementierung verdünnt, und die Zellen wurden 500 μl der geeigneten Virusverdünnung pro Kapität für 1 Stunde ausgesetzt. Nach Entfernung des infektiösen Überstands wurden vollständige Medien, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Doxycyclin supplementiert waren, zugefügt. Die Medien wurden alle 24 Stunden gewechselt.

Beispiel 4Quantifizierung der Transgen-Expression

24 Stunden nach Infektion mit Ad.CMV-luc oder Ad.3r-luc wurden die Zellen mit 150 μl Zellkultur-Lysisreagens nach den Angaben des Herstellers (Promega) geerntet. Die Luciferase-Aktivität in 20 μl Zell-Lysat wurde unter Verwendung eines Bertold LB9507 Luminometers und Luciferase-Assaysubstrat (Promega) gemessen. Die Standardkurven wurden unter Verwendung von rekombinanter Leuchtkäfer-Luciferase (Promega), das mit CCLR auf Konzentrationen von 1 pg/ml bis

300 ng/ml verdünnt war, erzeugt. Da die rlu bei höheren Konzentrationen ein Sättigungsprofil zeigen, wurde ein 2-Phasen exponentielles Assoziations-Kurvenfitting unter Verwendung des Prism Software-Pakets (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des DC-Protein-Assaykits (BioRad, Hercules, CA) bestimmt.

Die Quantifizierung des einzelkettigen und heterodimeren mIL12 in zellfreiem Überstand nach adenoviraler Infektion von Tumorzellen wurde durch einen IL12 p70 ELISA (OptEIA™, Pharmingen) durchgeführt, wobei gleiche Immunreaktivität und Molekulargewicht für beide Formen angenommen wurde. Splenozyten wurden mit Hilfe von Standardverfahren isoliert. Gehirnzellen wurden dann für drei Tage mit RPMI 1649 kultiviert, das mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin in anti-Maus CD3-beschichteten Kolben in Gegenwart von anti-human CD28 (5µg/ml) kultiviert, um T-Zellen anzureichern und die mIL-2-Sekretion zu stimulieren. Die Bioaktivität wurde nach Zugabe von 50-fach verdünntem konditionierten Überstand aus Ad.3r-scIL12 (+/- Doxycyclin), Ad.CMV-p40.IRES.p35 und mock-infizierten HT29-Zellen zu 4 x 10⁴ murinen Splenozyten in einem finalen Volumen von 125 µl für 24 Stunden bestimmt. Murines IFN-γ wurde in Splenozyten-freiem Überstand unter Verwendung eines IFN-γ ELISA (OptEIA™, Pharmingen) quantifiziert. Um die spezifische Bioaktivität zu bestimmen, wurden halblogarithmische Verdünnungen von konditioniertem Überstand von beiden Formen des adenoviral exprimierten mIL-12 und Baculovirus-exprimiertem, gereinigtem mIL12 (R&D systems) auf mIL-12-Immunreaktivität (p70 ELISA) und IFN-γ-Induktion in Splenozyten wie beschrieben getestet. Die Bioaktivität von adenoviral exprimiertem heterodimerem

IL-12 kann durch die Bildung inhibitorischer p40-Homodimerer wie anderweitig beschrieben reduziert werden. Es wurde vorliegend kein Capture-Bioassay verwendet, um potentiell niedrigere Bioaktivität *in vivo* zu reflektieren.

Beispiel 5

Alternative Klonierungsstrategie

Klonierung von adenoviralen Expressionsplasmiden für die Virussynthese mittels AdEasy System

Als Alternative zu der beschriebenen Virussynthese wurden adenovirale Expressionsplasmide entwickelt, die eine Virusgeneration mittels AdEasy®-System (Stratagene) ermöglichen. Dazu wurde der pShuttle Vektor (Stratagene) mit KpnI verdaut, gebluntet, und nachfolgend mit SalI verdaut. Das 3r-Insert wurde aus pBIG3r mittels Verdau mit PvuII und SalI isoliert und in den pShuttle ligiert. Das resultierende Plasmid pShuttle3r ermöglicht die einfache Generation verschiedener adenoviraler Vektoren zur Doxyzyklin-supprimierbaren Genexpression. Das humane Single-Chain Interleukin-12 kann nachfolgend mittels XhoI in die multiple cloning site des pShuttle3r kloniert werden und resultiert in pShuttle3r-hscIL12 (siehe Abbildung).

Die Virusgeneration erfolgt dann durch homologe Rekombination mit pAdEasy-1® in BJS183 E. coli-Zellen und Selektion für Kanamycin. Nach Transfektion von 293 Zellen mit dem Rekombinationsprodukt entstehen in diesem System replikative rekombinante adenovirale Vektoren (T He, S Zhou et al. Proc Natl Acad Sci USA 95 (5): 2509-14).

Die Virusproduktion erfolgt dann wie vorbeschrieben in 293-Zellen.

Beispiel 6Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunblotting

Nach Infektion von HT29-Colon Krebszellen wurden Lysate auf 15% Acrylamid SDS-Gele nach Kochen in Laemmli-Probenpuffern unter reduzierenden Bedingungen geladen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf 0,45 µm Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) transferiert und mit TBS-enthaltender 5% nicht-fetter Trockenmilch für 1 Stunde geblockt. Actin und das Fusionsprotein tTA wurden unter Verwendung eines Kaninchen anti-Actin Affinitäts-isolierten Antigen-spezifischen Antikörpers (#A2066, Sigma, St. Louis, MS) und eines Maus anti-TetR monoklonalen Antikörpers (M. Gossen et al., PNAS USA 89 (1992) 5547-5551) (#8632-1, Clontech) nachgewiesen. Nach Inkubation für 1 Stunde wurden die Blots mit TBS-enthaltendem 0,1% Tween-20, pH 7,5, gewaschen und mit anti-Kaninchen und anti-Maus Peroxidase-verknüpften sekundären Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Proteine wurden schließlich nach Waschen und Chemolumineszenz-Nachweis (SA Nesbitt et al. Anal. Biochem. 206 (1992) 267-272) (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) nach Vorschrift des Herstellers visualisiert.

Beispiel 7Tetracyclin-Screening von Blutspender-Seren

Eine Frau und sieben Männer im Alter zwischen 23 und 35 Jahren wurden als Probanden ausgewählt. Sie hatten für

mindestens einen Monat keine antiinfektiöse Behandlung erhalten. Alle waren gesund und unter einer westlichen Standardernährung. 50 ml peripheren venösen Bluts wurden entnommen, und das Serum wurde nach Standardverfahren erhalten. Die Seren unterliefen einem Gefrier-Auftau-Zyklus, bevor die Zellkultur-Experimente und Tetracyclin-Bestimmungen durchgeführt wurden. Humane Seren wurden anstelle von FBS den Zellkulturmedien zugegeben. Tetracyclin-HCl wurde von Fluca Chemicals (Fluca, Germany) gekauft. Bakerbond RP-18 Festphasenextraktions (SPE)-Säulen wurden von Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ) erhalten, Lösungsmittel in HPLC-Qualität und andere Chemikalien wurden von Merck (Whitehouse Station, NJ) gekauft. HPLC wurde an Constametric 3500 MS und RP-18 HyPURITY® ADVANCE-Säulen von ThermoQuest (Deutschland) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung von Chemstation Software von Agilent (Deutschland) nach Vorkonditionierung der RP-18-Säulen mit 2 x 1 ml Methanol, gefolgt von 2 x 1 ml Wasser, wurden 3 ml Serum, das 0,1 mol/l Citratpuffer (pH 6,8) und 0,1 mol/l EDTA enthielt, bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. zugegeben. Die Säulen wurden dann mit 10 ml Wasser und 1 ml Methanol gewaschen. Tetracyclin wurde mit 4 ml Methanol, das 0,1% Trifluoressigsäure enthielt, eluiert (ME Sheridan et al. J. Chromatography 434 (1988) 253-258). Das Eluat wurde getrocknet und in 100 µl 0,01% Oxalsäure in Wasser/Acetonitril (98/2 v/v) bei einem mit HCl eingestellten pH-Wert von 2,0 rekonstituiert. Die Chromatographie wurde bei Raumtemperatur und einer Fließgeschwindigkeit von 0,9 ml/min. durchgeführt. Die Fluoreszenz bei 416 nm (Anregung) und 515 nm (Emission) wurde durch Komplexierung des Tetracyclins mit 0,2% (w/v) Zirkonium(IV)chlorid erreicht (K. De Wasch et al. Analyst 123 (1998) 2737-2741). Die Kalibrierung wurde mit

wässrigen Lösungen von Tetracyclin HCl von 2 bis 100 ng/ml mit Variationskoeffizienten von 6,3% (während eines Tages) und 8,5% (von einem Tag auf den anderen) für 10 ng/ml durchgeführt.

Resultate

Konstruktion von Doxycyclin-supprimierbaren, auto-regulierten adenoviralen Vektoren

Adenovirale Expressionsplasmide, die das Luciferase- und murine scIL-12-Gen unter Kontrolle des Tetracyclin-supprimierbaren autoregulierten Systems enthielten, pAd.3r-luc und pAd.3r-scIL-12 wurden erzeugt. Nach einem gleichen Verfahren wurden Plasmide erzeugt, die das Luciferase-Gen und die cDNA, die für murines p40 und p35, das durch einen Internal Ribosome Entry Site (IRES), jeweils unter Kontrolle des Zytomegalivirus (CMV)-Promotors, enthalten. Rekombinate E1/E3-deletierte Adenoviren Ad.3r-luc, Ad.3r-scIL12, Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35 (Figur 2) wurden durch Cotransfektion adenoviraler Expressionsplasmide mit pBHG10 erzeugt. Die Plaque-Reinigung und Amplifizierung wurde in 293-Zellen durchgeführt. Adenovirale Titer wurden durch Standard-Plaque-Assay-Techniken quantifiziert. Isolierung, Amplifikation und Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 war in Gegenwart von 2 µg/ml Doxycyclin bis zu 87-fach höher, was auf die Toxizität nicht supprimierter scIL12-Expression in 293-Zellen hinweist (Figur 3). Im Gegensatz dazu hatte Doxycyclin keinen Einfluß auf die Titrierung von Ad.3r-luc.

Dosis-abhängige Doxycyclin-regulierte Luciferase- und
Transaktivator-Genexpression

Humane Colon-Krebszellen HT29 sind gegenüber adenoveraler Transduktion äußerst empfänglich, wie bereits zuvor gezeigt (A. Block et al. Cancer Gene Therapy 7 (2000) 438-445). Diese Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. (multiplicity of infection) von 30 nach Inkubation mit Doxycyclin bei verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden infiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde in Zelllysaten entsprechend dem gelösten Zellprotein bestimmt. Bereits geringe Doxycyclin-Konzentrationen wie 100 pg/ml führen zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression. Die Genexpression wurde schließlich mit Doxycyclin-Konzentrationen von bis zu 3 µg/ml maximal supprimiert (Figur 4). Diese Doxycyclin-Konzentration wird üblicherweise in der klinischen Behandlung bakterieller Infektionen verwendet. Im vorliegenden experimentellen Ansatz lag eine bis zu 2400-fache Doxycyclin-vermittelte Suppression der Transgen-Expression vor.

Die dosis-abhängige, Doxycyclin-regulierte Supression der positiven Feedback-Schleife (Figur 1) wurde durch Nachweis der tTA Fusionsproteine mit Tet-R monoklonalen (M. Gossen et al., PNAS U.S.A. 89 (1992) 5547-5551) und VP16 polyklonalen Antikörpern (PE Pellett et al. PNAS U.S.A. 82 (1985) 5870-5874) in Western Blot-Analysen illustriert (Figur 5). Steigende Doxycyclin-Konzentrationen führten zu einer Herunterregulierung der intrazellulären tTA-Anteile, was mit einer verminderten Luciferase-Genexpression korreliert.

M.O.I.-abhängige, supprimierbare Luciferase-Expression

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc bei einer m.o.i. im Bereich von 0,1 bis 100 nach Inkubation in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin bei 2 µg/ml für 24 Stunden infiziert. Die Suppression der Luciferase-Gen-Expression in Lysaten von Ad.3r-luc-infizierten HT29-Zellen bewegte sich von 470 (m.o.i.: 0,3) bis 2400-fach (m.o.i.: 10 - 100) (Figur 6). Das Ausmaß der Suppression blieb bei hohen m.o.i. konstant, was für eine ausreichende, mit der Transgen-Expression zusammenhängende Toxizitätskontrolle entscheidend ist. Doxycyclinkonzentrationen von 2 µg/ml störten die adenovirale Genexpression in HT29-Zellen unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors nicht. Um die Effizienz der Ad.3r-luc-vermittelten transgenen-Expression in Abwesenheit von Doxycyclin zu untersuchen, wurde die Expression mit der Expression in HT29-Zellen verglichen, die mit Ad.CMV-luc infiziert waren (Figur 7). In HT29 zeigte Ad.3r-luc eine höhere Genexpression als Ad.CMV-luc über alle getesteten m.o.i. (1 - 100), wobei der Faktor zwischen 18-fach (m.o.i.:100) und 240-fach (m.o.i.:1) lag.

M.O.I.-abhängige regulierte Expression des einzelnkettigen murinen Interleukin-12

HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-scIL-12 bei einer m.o.i. im Bereich von 1 bis 100 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin für 24 Stunden inkubiert. Die Genexpression von ScIL-12 wurde um mehr als 1400-fach bei einer m.o.i. von 100 in Gegenwart von Doxycyclin supprimiert (Figur 8). Die Western Blot-Analyse zeigte eine mit der IL-12 Expression korellierende Transaktivator (tTA)-Expression

(Figur 9). Nicht-supprimierte 3r-vermittelte IL-12 Genexpression war 11-fach (m.o.i.:1) bis 375-fach (m.o.i.:100) höher als unter Verwendung des konstitutiven CMV-Promotors, wobei von gleicher Immunreaktivität des p70-ELISA gegenüber dem einzelkettigen Interleukin-12 und der CMV-gesteuerten Expression eines p40/p35-Heterorotrimers ausgegangen wurde. Die Bioaktivität beider Formen wurde durch Inkubation muriner Splenocyten mit 50-fach verdünnten konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit IL-12 exprimierenden Adenoviren quantifiziert (Figur 10). Es wurde eine hohe Interferon- γ (IFN- γ) -Sekretion der Splenocyten durch Inkubation mit konditionierten Medien nach Infektion von HT29 mit Ad.3r-sc-IL-12 erhalten. Diese IFN- γ -Induktion war verglichen mit der Infektion von HT29 mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.IRES.p35 signifikant höher. Die Zugabe von Doxycyclin resultierte in einer Suppression von IFN- γ auf einen Hintergrund-Level. Ferner wurde die spezifische Bioaktivität adenovirale exprimierter Formen von IL-12 im Vergleich zu rekombinant gereinigten p40/p35-Heterodimeren analysiert (Figur 11). Murine Splenocyten wurden mit halblogarithmischen Verdünnungen von rekombinant heterodimerem IL-12 oder konditionierte Medien enthaltendem IL-12 wie beschrieben inkubiert. Die IFN- γ -Induktion korellierte mit der Immunreaktivität von IL-12 in den Medien, wie durch p70-ELISA nachgewiesen wurde. Die basale Induktion wurde durch Präinkubation von Splenocyten mit Anti-humanen CD28-Antikörpern verursacht, was zur IL-2-Expression und nachfolgenden IFN- γ -Induktion führte (CH June et al., J. Immunol. 143 (1989) 153-161). Die Bioaktivität des murinen einzelkettigen IL-12 Fusionsproteins war mit dem gereinigten, rekombinanten p40/p35-Heterodimer vergleichbar. Die

reduzierte Bioaktivität von IL-12, das nach Infektion mit dem gewöhnlich verwendeten Ad.CMV-p40.IRES.p35 exprimiert wurde, erklärt sich durch inhibitorische p40-Homodimere (P. Ling et al. J. Immunol. 154 (1995) 116-127; S. Gillesen et al. European J. Immunol. 25 (1995) 200-206; F. Mattner et al. European J. Immunol. 23 (1993) 2202-2208).

Regulierte Interleukin-12 Genexpression in vitro

Verschiedene Zelllinien des humanen Colon Karzinom (HT29, SkCo-1 und Colo205), pankreatischen Karzinom (Aspc-1), Blasen-Karzinom (RT4), Cervix-Karzinom (HeLa), Brust-Karzinom (MCF-7 und BT-20) sowie Myolom (U266) und hepatzelluläres Karzinom (HepG2) wurden entweder mit Ad. CMV.p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL-12 infiziert und in Gegenwart oder Abwesenheit von Doxycyclin inkubiert. Die Expression des rekombinanten Interleukin-12 wurde unter Verwendung eines p70-ELISA wie zuvor beschrieben bestimmt (Figur 12). Die Doxycyclin-vermittelte Suppression der Interleukin-12-Expression trat in allen Zelllinien auf. In Abwesenheit von Doxycyclin erwies sich der 3r-Promotor gegenüber dem CMV-Promotor in allen Zelllinien mit Ausnahme der U266-Myolomzelllinie als überragend. Die Interleukin-12-Expression in Mock-transfizierten Zelllinien wurde nicht nachgewiesen. Die Suppression des IL-12 war 3,9-fach in U266 und bewegte sich von 167 (HepG2) bis 6000-fach (Aspc-1). Mit Ausnahme von U266, wo eine gegenüber der CMV-vermittelten IL-12-Expression signifikant geringere 3r-vermittelte IL-12 Expression vorlag, führte der 3r-Promotor in allen anderen Krebszelllinien zu 17-fach (SkCo-1) bis 4254-fach (Colo205) höherer Genexpression in Abwesenheit von Doxycyclin.

Regulierte Genexpression nach Inkubation mit Humanserum

In Abetracht der geringen Doxycyclin- und Tetracyclin (tet)-Konzentrationen, die zur Suppression der Transgen-Expression erforderlich sind, wurde die Regulation in humanen Colon-Krebszellen in Gegenwart von humanem Serum untersucht, um die Anwendbarkeit dieses Ansatzes in einem möglichen klinischen Umfeld zu prüfen. Serumproben von gesunden Probanden, die sich einer westlichen Standardernährung unterzogen, wurden unter Verwendung eines Standard HPLC-Verfahrens mit einer maximalen Sensitivität von 2 ng/ml auf Tetracyclin getestet, da Tetracyclin in der Nutztierhaltung breite Anwendung findet und eine Kontamination von Nahrungsmitteln anzunehmen ist. Die HPLC zeigte keine signifikanten Tetracyclin-Konzentrationen in allen getesteten Proben. HT29-Colon-Karzinomzellen, die nach Inkubation mit diesen humanen Seren mit Ad.3r-luc (m.o.i.: 30) infiziert wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Transgenexpression verglichen mit zertifiziertem, Tetracyclin-freiem fötalem Rinderserum (Figur 13). Diese Beobachtung spiegelt Tetracyclin-Konzentrationen in humanen Serumproben von weniger als 10 pg/ml wieder. Wie erwartet, führte die Supplementierung dieser Humanseren mit Doxycyclin ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) zu einer äußerst effizienten Suppression der Transgen-Expression.

Beschreibung der Figuren

Figur 1. Prinzip einer autoregulierten, Tetracyclin-abhängigen Transaktivator-Expression. Der bidirektional tetrareponsive Promotor kontrolliert sowohl das Transgen als auch die Transaktivator-Expression. Bindung des Transaktivators in Abwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin resultiert in einer Amplifikation der Transaktivator-Expression durch eine positive Feedback-Schleife, ebenso wie in einer Induktion der Transgen-Expression. tTA, Tet-Repressor und VP16 Fusionsproteine; TKmin, minimaler Thymidin-Kinase-Promotor; CMVmin, minimaler Zytomegalovirus-Promotor; TetO₇, heptamerisierter Tet-Operator.

Figur 2. Adenovirale Vektorkarten. Die autoregulierte Tetracyclin-Expressionskassette ist in die ΔE1-Region des adenoviralen Genoms inseriert. Zur Vermeidung von kryptischem Splicing und um RNA-Stabilität zu erhalten (Ad.3r-luc und Ad.3r-scIL12) wurde ein Intron aufwärts vom Aktivator und dem Luciferase- oder Interleukin-12-Gen aus der Maus eingefügt. Zusätzlich wurden rekombinante adenovirale Vektoren für die Expression des Luciferase- oder des heterodimeren Interleukin-12-Gens der Maus unter der Kontrolle des CMV-Promotors konstruiert (Ad.CMV-luc und Ad.CMV-p40.IRES.p35). E1 und E3, Early regions des adenoviralen Genoms; IRES, interne Ribosomen-Eintrittsstelle; CMV, Zytomegalievirus-Promotor; TK, Thymidin-Kinase-Promotor.

Figur 3. Plaque-Assay von Ad.3r-scIL12 in An- und Abwesenheit von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml. Titration von Ad.3r-scIL12 in 293-Zellen resultiert in einer erheblich

höheren Ausbeute, wenn die Expression des Transgens durch Zugabe von Doxycyclin unterdrückt wird. Dox, Doxycyclin.

Figur 4. Dosisabhängige Luciferase-Expression nach Infektion von HT29 Dickdarmkrebszellen mit Ad.3r-luc gefolgt von verschiedenen Konzentrationen des Tetracyclin-Derivats Doxycyclin.

Figur 5. Westernblot-Analysen des Transaktivators zeigen die positive Rückkoppelungsschleife nach adenoviraler Infektion von HT29-Zellen unter Inkubation mit unterschiedlichen Mengen von Doxycyclin. Die Figur zeigt die Unterdrückung der Expression des tTA Fusionsproteins in Anwesenheit von Doxycyclin. dox, Doxycyclin.

Figur 6. Unterdrückung der Luciferase-Genexpression nach Infektion von HT29-Zellen mit verschiedenen Multiplizitäten der Infektion (multiplicities of infection, m.o.i.). Doxycyclin-regulierte Genexpression wird in einem großen Infektionsbereich von wenigstens 0,1 bis 100 m.o.i. erzielt, die in einer 470- bis 2400-fachen Unterdrückung der Luciferase-Expression resultiert.

Figur 7. Vergleich der 3r-vermittelten Transgen-Expression bei Verwendung des konstitutiven Zytomegalievirus-Promotors. HT29-Zellen wurden mit Ad.3r-luc oder Ad.CMV-luc in verschiedenen m.o.i. infiziert, gefolgt von einer Inkubation in Doxycyclin-freiem Medium.

Figur 8. Interleukin-12-Expression in HT29-Zellen nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin (2 µg/ml) oder Ad.CMV-mIL12 bei verschiedenen

m.o.i. Wie mit Luciferase-exprimierenden adenoviralen Vektoren gezeigt wurde, befindet sich in HT29 eine erheblich höhere Interleukin-12-Expression, wenn der 3r-Promotor verwendet wird. Zugabe von Doxycyclin führt zu einer Unterdrückung der Transgen-Expression unter das Niveau, das mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei der selben m.o.i. erzielt wird.

Figur 9. Westernblot-Analyse der tTA Transaktivator-Genexpression in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin nach Infektion mit Ad.3r-scIL12 bei verschiedenen m.o.i.. Beide Domänen des tTA Fusionsproteins wurden mit den TetT- und VP16-Antikörpern nachgewiesen. Die Expression des tTA Fusionsproteins korreliert mit der eingesetzten m.o.i.. Zugabe von Doxycyclin in einer Konzentration von 2 µg/ml resultiert in einer Unterdrückung der tTA Expression. TetR, Tetracyclin-Repressor; VP16, Herpes simplex Virus transkriptionale Aktivierungsdomäne.

Figur 10. Induzierung der Interferon- γ -Expression nach Inkubation von Splenozyten mit konditioniertem Überstand von infizierten HT29-Zellen. 10^6 HT29-Zellen wurden mit Ad3r-scIL12 (+/- Dox) oder Ad.CMV-p40.IRES.p35 bei einer m.o.i. von 30 für 24h infiziert. Infektion von HT29 mit Ad.3r-scIL12 resultiert in einer starken Interferon- γ -Induktion im Vergleich zu einer Infektion mit Ad.CMV-p40.IRES.p35. Zugabe von Doxycyclin resultiert in einer Abnahme des Interferon- γ auf Hintergrundniveau in diesem Versuchsansatz.

Figur 11. Vergleich der Interferon- γ -Induktion durch adenoviral-exprimiertes Einzelketten- (single-chain), bzw. heterodimeres Interleukin-12, sowie durch aufgereinigtes rekombinantes Interleukin-12. Interleukin-12 im

konditionierten Überstand von infizierten HT29-Zellen wurde durch p70-mIL12 ELISA bestimmt. Mäuse-Splenozyten wurden dann mit seriellen Verdünnungen von entweder adenoviral exprimierten oder rekombinannten Interleukinen inkubiert und das induzierte Interferon- γ wurde mit mIFN- γ ELISA quantifiziert. Die Bioaktivität-Immunoreaktivität von Einzelketten-Interleukin-12 war vergleichbar zu rekombinantem aufgereinigtem heterodimerem Interleukin-12. Die spezifische Bioaktivität von adenoviral produziertem heterodimerem Interleukin-12 (Ad.CMV-p40.IRES.p35) scheint niedriger zu sein, wahrscheinlich durch inhibitorische p40 Homodimere.

Figur 12. Interleukin-12-Expression in verschiedenen Zelllinien nach Infektion mit entweder Ad.CMV-p40.IRES.p35 oder Ad.3r-scIL12 in An- oder Abwesenheit von Doxycyclin. Unterschiedliche Stärken der Transgenexpression beruhen z.T. auf Unterschieden in der Transduktionseffizienz. Mit Ausnahme der U266 Myelomzelllinie war die 3r-vermittelte Genexpression deutlich höher als die CMV-vermittelte Expression.

Figur 13. Inkubation von Ad.3r-luc infizierten HT29 Dickdarmkarzinomzellen mit menschlichen Seren anstatt zertifiziertem Tetracyclin-freiem fötalem Rinderserum. Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung von menschlichem Serum von Probanden mit einer standardisierten westlichen Ernährung im Vergleich mit zertifiziertem Tetracyclin-freiem fötalem Kälberserum. Diese Daten legen eine Tetracyclin-Konzentration bei den menschlichen Probanden von unter 50 pg/ml nahe. Die Ergänzung der menschlichen Sera mit Doxycyclin (2 μ g/ml) resultiert in einer Unterdrückung der Transgen-Expression wie vorgehend gezeigt. FCS, fötales Kälberserum.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
<120> Rekombinante virale Vektoren zur Tetracyclin-regulierbaren Genexpression
<130> P 60239
<160> 5
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 11569
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.hscIL-12 zur regulierten Expression des humanen IL-12

<220>
<221> gene
<222> (327)..(713)
<223> VP16

<220>
<221> gene
<222> (714)..(1352)
<223> TetR

<220>
<221> Intron
<222> (1353)..(1912)
<223>

<220>
<221> promoter
<222> (1864)..(1902)
<223> TK-min

<220>
<221> protein_bind
<222> (1913)..(2212)
<223> TetO7

<220>
<221> misc_feature
<222> (2213)..(2709)
<223> CMV-min + Intron

<220>
<221> promoter
<222> (2226)..(2264)
<223> CMV-min

<220>
<221> gene
<222> (2710)..(4308)
<223> Humanes single-chain IL-12

<220>
<221> mutation
<222> (4020)..(4023)
<223> T/C, A/T, G/C, T/G

<400> 1

ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccacccg	catccccagg	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctcccc	cttgcgtgtcc	tgccccaccc	caccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gagggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tgcaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctcttagga	tgcatectcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtdcaattcc	aagggcatcg	360
gtaaacatct	gctcaaactc	gaagtggcc	atatccagag	cgccgttaggg	ggcggagtcg	420
tggggggtaa	atcccgacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catgcccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgcccccc	540
aggctgacat	cgtcggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccgc	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgcccag	ccccgcctct	tcggggcggt	cgtcgccgg	gagatcgagc	660
aggccctcg	tggtagaccc	gtattgttt	ttcgtacgcg	cgcggctgt	cgcggaccca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaattccg	catatgatca	atccaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttgggt	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtataataa	tggccgcata	840
ctatca	taggtgtttc	ccttttttct	ttagcgactt	gatgtctttg	atttccat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacacgc	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagtgaa	960
aaaccttgtt	ggcataaaaa	ggctaattga	tttcgagag	tttcatactg	tttttctgt	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgttcca	tcgcgtatgc	ttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagtttccc	cttctaaagg	gcaaaaagtga	1140
gtatgggcc	tatcta	ctcaatggct	aaggcgtcg	gcaagccccg	cttatttttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	ggcgagttt	acgggttgc	1260
aaacctcga	ttccgaccc	attaagcgc	tctaatgcgc	tgttaatcac	tttactttt	1320
tctaattctag	agggtctgg	tctcttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccgggttg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagccgt	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaaagatt	gtcttttctg	accagatgg	cgccggccacc	ctcaaaggca	tcacccgggg	1560
ccaggtgaat	atcaaattcc	cctcggtttt	ggaaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gcccgtttt	gagagggagt	actcacc	acagtcgaga	ggtttccga	tccggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtggcgg	gtaccgttgc	gaggccgacg	gttttccgat	1740
ccaagagta	tgaaaagacc	gcaagagtt	tgtctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgc	gttcgtcg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	accttaat	gcgaagtgg	1860
cctcggaccg	cccccccccc	actgcac	ctgtttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcacttttct	ctatca	tagggagtgg	taaactcgcac	tttactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	gtttaactcg	actttactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaact	2040
cgactttcac	ttttcttat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgacttcc	actttctct	2100
atca	gggagtggta	aactcgactt	tcacttttct	ctatca	tagggagtgg	2160
taaactcgcac	tttca	ctctatca	gatagggagt	gtttaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cg	gtgtacgg	gggaggccta	tataagcaga	gtcggtttag	2280
gatgccttgg	agacgccatc	cacgcgttt	tgacccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaa	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gtttaattgc	2400
taacgcagtc	agtgc	ttctct	acacaacagt	ctcgaacta	agctgcagaa	2460
aggcacttgg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
ggcttgc	agacagagaa	gactttgcg	tttctgatag	gcacccatttg	gtcttactga	2580
catccactt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccg	tcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taata	ca	actataggc	tagcctcgag	aattcacgcg	2700
ctcgatcca	tggtcacca	gcagttggc	atctcttgc	tttccctgg	ttttctggca	2760
tctccctcg	tgccat	ggaactgaag	aaagatgtt	atgtcgat	atggatgg	2820
tatccggat	ccc	cttgggaga	aatgggtggc	ctcac	acaccctga	2880
atcacctgga	ccttggacca	gagcagtgg	gtcttaggt	ctggcaaaac	cctgaccatc	2940
caagtca	agtttggaga	tgctggccag	tacac	ctgtc	acaaaggagg	3000

agccattcgc tcctgctgct tcacaaaaag gaagatggaa ttgggtccac tgatattta 3060
 aaggaccaga aagaacccaa aaataagacc tttctaagat gcgaggccaa gaattattct 3120
 ggacgttca cctgctggg gctgacgaca atcagtactg atttgacatt cagtgtcaaa 3180
 agcagcagag gctcttctga cccccaagggg gtgacgtcg gagctgctac actctctgca 3240
 gagagagtca gaggggacaa caaggagtat gagtactcag tggagtgcca ggaggacagt 3300
 gcctgcccag ctgctgagga gagtctgcc attgaggtca tggtgatgc cgttcacaag 3360
 ctcagaatgaaaactacac cagcagcttc ttcatcaggg acatcatcaa acctgacc 3420
 cccaagaact tgcagctgaa gccattaaag aattctcggc aggtggaggt cagctgggag 3480
 taccctgaca cctggagtac tccacattcc tacttctccc tgacattctg cgttcagg 3540
 cagggcaaga gcaagagaga aaagaaaagat agagtcttca cggacaagac ctcagccac 3600
 gtcatctgccc gaaaaaatgc cagcattagc gtgcgggccc aggaccgcta ctatagctca 3660
 tcttggagcg aatgggcattc tggccctgc agtgggtggcg gtggcggccg atctagaaac 3720
 ctccccgtgg ccactccaga cccaggaatg ttccatgccc ttccaccactc ccaaaacctg 3780
 ctgagggccg tcagcaacat gtcagaagag gccagacaaa ctctagaatt ttacccttgc 3840
 acttctgaag agattgatca tgaagatatac aaaaaagata aaaccagcac agtggaggcc 3900
 tgtttaccat tggattaac caagaatgag agttgcctaa attccagaga gaccttttc 3960
 ataactaatg ggagttgcct ggcctccaga aagaccttctt ttatgtatggc cctgtccctc 4020
 tcgagtattt atgaagactc gaagatgtac caggtggagt tcaagaccat gaatgcaaaag 4080
 ctctgatgg atccataagag gcagatctt ctagatcaaa acatgctggc agttattgtat 4140
 gagctgatgc aggccctgaa ttcaacagt gagactgtgc cacaatatac ctccctgaa 4200
 gaaccggatt ttataaaaac taaaatcaag ctctgcatac ttcttcatgc tticagaatt 4260
 cggcagtgta ctattgatag agtgcattgac tatctgaatg ctccctaaaa agcgaggc 4320
 atccggatta gtcccaattt taaaagacag gatatcagtg gtccaggcgtc tagtttgac 4380
 tcaacaatat caccagctga agcctataga gtacgagcca tagataaaaat aaaagatttt 4440
 atttagtctc cagaaaaaagg ggggaatgaa agacccacc tggatgtttg gcaagctagt 4500
 aacggccgccc agtgtgctgg aattctgcag atatccatca cactggcggc cgctcgagca 4560
 tgcattcaga gggccctatt ctatagtgtc acctaaatgc tagactgc tgatcagc 4620
 cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg cttccctgaa 4680
 ccctggaaagg tgccactccc actgtccctt cctaataaaaa tgaggaattt gcatcgatt 4740
 gtctgagtag gtgtcattt attctggggg gtgggtggg gcaggacgc aagggggagg 4800
 attggaaaga caatagcagg catgcgtggg atgcgtggg ctctatggct tctgaggcgg 4860
 aaagaaccag tcgacatcgta tgctagatg gaaggtgcgt aggtacgtg agacccgcac 4920
 caggtgcaga ccctgcgagt gtggcgttaa acatattagg aaccagcctg tgatgtgga 4980
 tgtgacccgag gagctgaggc cgcattactt ggtgcgtggc tgcaccgcgc ctgagttgg 5040
 ctctagcgat gaagatacag attgaggtac tgaaatgtgt gggcgtggct taaggggtggg 5100
 aaagaatata taaggtgggg gtcttatgtta gttttgtatc tggtttgcag cagccggccgc 5160
 cgccatgagc accaactcgt ttgatggaa cattgtgagc tcatatttga caacgcgcatt 5220
 gccccatgg gccccggcgtc gtcagaatgt gatgggctcc agcattgtat gtcgccccgt 5280
 cctggccca aactctacta ccttgcacta cgagaccgtg tctggAACgc cggtggagac 5340
 tgcagccctcc gccggccgtt cagccgctgc agccaccggc cgccggattt tgactgactt 5400
 tgctttctg agcccgctt cttgcgtgc agcttccctt tcatccgcgc gcatgtacaa 5460
 gttgacggct cttttggcac aattggattt ttgacccgg gaaacttaatg tcgtttctca 5520
 gcagctgttg gatctgcgc agcagggttc tggccctgaag gcttccccc ctcccaatgc 5580
 ggtttaaaac ataaaataaaa aaccagactc tggtttggatt tggatcaagc aagtgtctt 5640
 ctgtctttat tttaggggttt tgcgcgcgc gtagggccgg gaccagcgtt ctgggtcg 5700
 gagggtcctg tgatttttt ccaggacgtg taaaaggta ctctggatgt tcagatacat 5760
 gggcataagg ccgtctctgg ggtggaggta gcaccactgc agagcttcat gtcgccccgt 5820
 ggtgtttagt atgatccagt ctagcagga ggcgtggcc tggtgcctaa aaatgtctt 5880
 ctagacaaatg ctgattggca ggggcaggcc ctgggtgtaa gtgtttacaa agcggttaag 5940
 ctgggatggg tgcatacgtg gggatatgag atgcattctg gactgtat tttaggttggc 6000
 tatgttccca gccatataccc tccggggatt catgttgc agaaccacca gcacagtgt 6060
 tccgggtgcac ttggggaaatt tgcattgttag cttagaaggaa aatgcgtgga agaacttgg 6120
 gacggcccttgc tgacctccaa gatttccat gcattcgcc ataatgtatgg caatggccc 6180
 acggggcggcgc gcctgggcga agatatttct gggatcacta acgtcatatgt tgcgttcc 6240
 gatgagatcg tcataggcctt ttttacaaa ggcggggccgg agggtgccag actgcggat 6300
 aatggttcca tccggccca gggcgttagt accctcatac atttgcattt cccacgc 6360
 gagttcagat gggggatca tgcattgttag cggggcgtatg aagaaaacgg ttccggggt 6420
 agggggatgc agctgggaag aaagcagggtt cctgagcagc tgcgacttac cgcagccgt 6480
 gggccctgtaa atcacaccta ttaccgggtg caactggtag ttaagagagc tgcagctg 6540
 gtcatccctg agcagggggg ccacttcgtt aagcatgtcc ctgactcgca tgcgttccct 6600
 gaccataatcc gccagaaggc gctcgccgc cagcgatagc agttcttgcga aggaagcaaa 6660

acgctcgctg tttggtatgg cttcatttag ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac	10380
atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggt tagctccttc ggtcctccga tcggtgtcag	10440
aagtaagttg gcccgagtgt tatcactcat gttatggca gcactgcata attctttac	10500
tgtcatgcca tccgtaagat gctttctgt gactggtag tactcaacca agtcatctg	10560
agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc ttgcccggcg tcaacacggg ataataccgc	10620
gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa cgttttcgg ggcgaaaact	10680
ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcatgtta cccactcgtg cacccaaactg	10740
atcttcagca tctttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa	10800
tgccgcaaaa aaggaaataa gggcgacacg gaaatgttga atactcatac tcttccttt	10860
tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg	10920
tattnagaaa aataaaacaaa taggggttcc ggcacattt ccccgaaaag tgccacctga	10980
cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc	11040
ctttcgctt caagaattct tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg	11100
cccttcgtc atcatcaata atatacctta ttttgattt aagccaatat gataatgagg	11160
gggtggagtt tggacgtgg cgccggcggt gggAACGGGG CGGGTGTACGT agtagtgtgg	11220
cggaagtgtg atgttgcaag tggccggaa cacatgttaa cgccggatgt ggtaaaagtg	11280
acgtttttgg tggcgccgg tggatacggg aagtgacaat ttccgcccgg ttttaggcgg	11340
atgtttagt aaatttgggc gtaaccaagt aatgtttggc cattttcgcg ggaaaactga	11400
ataagagggaa gtgaaatctg aataattctg tggtaactcat agcgcgtaat atttgtctag	11460
ggccgcgggg actttgaccg ttacgtgga gactcgccca ggttttttc tcaggtgttt	11520
tccgcgttcc gggtaaagt tggcggttta ttattatagt cagctctag	11569

<210> 2

<211> 11458

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r.mscIL-12 zur regulierten Expression des murinen IL-12

<220>

<221> gene

<222> (327)..(713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714)..(1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353)..(1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864)..(1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913)..(2212)

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213)..(2687)
 <223> CMV-min + Intron

<220>
 <221> promoter
 <222> (2226)..(2264)
 <223> CMV-min

<220>
 <221> gene
 <222> (2688)..(4325)
 <223> Murines single-chain IL-12

<400> 2

ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccaccc	catccccagg	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctccccc	cttgctgtcc	tgcccccaccc	caccccccagg	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gagggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgact	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctcttagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcacatcg	360
gtaaaacatct	gctcaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgttaggg	ggcggagtcg	420
tgggggttaa	atccccggacc	cggggaatcc	cggtccccca	acatgtccag	atcgaaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgcccccc	540
aggctgacat	cggtcgggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccgc	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgtcgccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtattttttt	ttcgtacgcg	cgcggctgt	cgcggaccacca	720
ctttcacatt	taagttttt	ttctaatccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtaataa	tggcggcata	840
ctatcagtag	taggtttttc	cctttttct	ttagcgactt	gatgcttttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcatt	ataatgcatt	ctctagtgaa	960
aaaccttgtt	ggcataaaaaa	ggctaattga	ttttcgagag	tttcataactg	tttttctgt	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	tttgcctca	tcgcgatgac	tttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatctgc	cagtttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatgggcc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaaagcccg	tttatttttt	1200
acatgcaat	acaatgttagg	ctgctctaca	cctagcttct	ggggaggttt	acgggttgtt	1260
aaaccttoga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcgc	tgtaatatc	tttactttta	1320
tctaattctag	agggtctggg	tctctttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgcggccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccgggttgg	acctggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagccctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtctttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaattcct	cctcggtttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gccccgtttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	gttttccga	tccggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtggcgg	gtaccgttcg	gaggccgacg	gttttccgat	1740
ccaagagatc	tgaaaagacc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgcgt	ggtcgctcgg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtgg	1860
cctcggaccg	cgccgccccg	actgcacatctg	cgtgttcgaa	ttgccccggcg	agctcgactt	1920
tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttcaacttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	gttaaactcg	actttactt	ttctctatca	ctgataggg	gtggtaaact	2040
cgactttcac	tttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	actttctct	2100
atcaactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgac	tttcactttt	ctctatcact	gatagggagt	gttaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggagggcta	tataaggcaga	gctcgtttag	tgaaccgtca	2280
gatgcctgg	agacgccatc	cacgctttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggccccgaaat	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgtttctg	acacaacagt	ctcgaactt	agctgcagaa	gttggtcgtg	2460
aggcactggg	caggtaaagta	tcaagggtac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgcgc	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgtatag	gcacccattt	gtcttactga	2580
catccacttt	gccttctct	ccacaggtgt	ccactcccg	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggc	tagcctcgag	aattcgaatg	gccatgggtc	2700
ctcagaagct	aaccatctcc	tggtttgc	tcgttttgc	ggtgtctcca	ctcatggcca	2760
tgtggagact	ggagaaaagac	gtttatgttg	tagaggtgga	ctggactccc	gatgcccctg	2820

gagaaaacagt gaacctcacc tggacacacgc ctgaagaaga tgacatcacc tggacccatg 2880
 accagagaca tggagtcatg ggctctggaa agaccctgac catactgtc aaagaggttc 2940
 tagatgtgg ccagtacacc tgccacaaag gaggcgagac tctgagccac tcacatctgc 3000
 tgctccacaa gaaggaaaat ggaatttggg ccactgaaat tttaaaaaat ttcaaaaaca 3060
 agactttcct gaagtgtgaa gcaccaaatt actccggacg gttcacgtgc tcatggctgg 3120
 tgcaaagaaa catggacttg aagttcaaca tcaagagcag tagcagttcc cctgacttc 3180
 gggcagtgac atgtggatg gcgctctgt ctgcagagaa ggtcacactg gaccaagg 3240
 actatgagaa gtattcagtg tcctgccagg aggatgtcac ctgcccact gcccaggaga 3300
 ccctgcccatt tgaactggcg ttggaaagcac ggcagcagaa taaatatgag aactacagca 3360
 ccagcttctt catcagggac atcatcaaac cagacccgcc caagaacttg cagatgaagc 3420
 ctttgaagaa ctcacaggtg gaggtcagct gggagtagcc tgactcctgg agcactcccc 3480
 attcctactt ctccctcaag ttctttgttc gaatccagcg caagaaagaa aagatgaagg 3540
 agacagagga ggggtgtaac cagaaaggtg cgttcctgt agagaagaca tctaccgaag 3600
 tccaatgcaa aggccggaat gtctgcgtgc aagctcagga tcgttattac aattcctcat 3660
 gcagcaagt ggcatgtgtt ccctgcaggg tccgatccgg tggcggtggc tcggcggtg 3720
 gtgggtcggg tggcgccgga tctagggtca ttccagtc tggacctgccc aggtgtctta 3780
 gccagtcgg aaacctgctg aagaccacag atgacatgtt gaagacggcc agagaaaaac 3840
 tgaaacatta ttccctgcact gctgaagaca tcgatcatga agacatcaca cgggacc 3900
 ccagcacatt gaagacctgt ttaccactgg aactacacaa gaacgaggt tgcctggcta 3960
 ctagagagac ttcttccaca acaagaggaa gctgcctgccc cccacagaag acgtcttga 4020
 ttagtgcacct gtgccttggg agcatctatg aggacttggaa gatgtaccag acagagtcc 4080
 aggccatcaa cgcagcactt cagaatcaca accatcaga gatcattcta gacaagg 4140
 tgctggtggc catcgatgag ctgatgcagt ctctgaatca taatggcgag actctgcg 4200
 agaaaacccc tgggggagaa gcagaccctt acagagtggaa aatgaagctc tgcattctgc 4260
 ttcacgcctt cagcacccgc gtcgtgacca tcaacagggt gatggctat ctgagctcc 4320
 cctgagaatt gatccggatt agtccattt gttaaagaca ggatgggccc tatata 4380
 tccactagta acggccgcca gtgtgctgga attctgcaga tatccatcac actggcg 4440
 gctcgagcat gcatctagag ggccttattc tatagtgtca cctaaatgtc agagctcg 4500
 gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tggttgcctt tccccctgc 4560
 cttccttgc cctgaaagggt gccactccca ctgtccttcc ctaataaaat gaggaaattg 4620
 catcgattt tctgagtagg tgcattcta ttctgggggg tgggggggg caggacagca 4680
 agggggagga ttggaaagac aatagcaggc atgctgggg tgcgggtggc tctatggctt 4740
 ctgaggcgga aagaaccagt cgacatcgat gctagagtgg aagggtgtga ggtacgtga 4800
 gacccgcacc aggtgcagac cctgcgagtg tggcggtaaa catattagga accagcc 4860
 gatgctggat gtgaccgagg agctgaggcc cgatcttgc gtgctggcct gcacccgcgc 4920
 tgagtttggc tctagcgatg aagatacaga ttgaggtaact gaaatgtgt ggcgtggctt 4980
 aagggtggga aagaatataat aagggtgggg tcttatgttag tttgtatct gtttgc 5040
 agccgcgcgc gccatgagca ccaactcggt tgatggaaagc attgtgagct catatttgc 5100
 aacgcgcatg ccccatggg cgggggtgc tcagaatgtg atgggtctca gcattgatgg 5160
 tcgccccgtc ctgccccca gttggagact gcagcctccg gactgacttt gcttcttgc 5220
 gactgactt gcttcttgc gcccgttgc aagcagtgc gcttcccgat catccgc 5280
 cgatgacaag ttgacggctc ttttggcaca attggattct ttgacccggg aacttaatgt 5340
 cggttctcag cagctttgg atctgcgcaca gcaggtttct gcccgttgc aaggcttcccc 5400
 tcccaatgcg gttaaaaca taaataaaa accagactct gtttggattt ggtatcaagca 5460
 agtgtcttgc tttttttt taggggtttt ggcgcgcgg taggcccggg accagcg 5520
 tcggtcgtt agggctctgt gtatttttt caggacgtgg taaaggtgac tctggatgtt 5580
 cagatacatg ggcataagcc cgtctctggg gtggaggttag caccactgc gagcttcatg 5640
 ctgcgggggtt gtgttgtaga tgatccagtc gtagcaggag cgctggcggt ggtgcctaaa 5700
 aatgtcttgc agtagcaagc tgattgcag gggcaggccc ttgggttaag ttttacaaa 5760
 gcggttaagc tgggtgggt gcatacgtgg ggatatgaga tgcacatcttgc actgtat 5820
 taggttggc atgtttccag ccataatccct cgggggattt atgttgtgca gaaccaccag 5880
 cacagtgtat ccgggtgcact tggaaattt gtcatgttagc ttagaaggaa atgcgtggaa 5940
 gaacttggag acgccttgc gacccatcag atttccatg cattcgccca taatgatggc 6000
 aatggggccca cggggggcgcc cctggggcga gatatttctg ggatcactaa cgtcatagg 6060
 gtgttccagg atgagatcgt cataggccat ttttacaaag cgcggggcga ggggtgc 6120
 ctgcgggtata atgggtccat cggcccccagg ggcgttagtta ccctcacaga tttgcatttc 6180
 ccacgccttgc agttcagatg gggggatcat gtctacctgc gggggcgatga agaaaacgg 6240
 ttccggggta ggggagatca gctgggaaga aagcaggatc ctgagcagct gcgacttacc 6300
 gcagccgggtt gggccgtaaa tcacacccat taccgggtgc aactggtagt taagagagct 6360
 gcagctgcgc tcatccctga gcagggggc cacttcgtta agcatgtccc tgactcgcat 6420
 6480

gttttccctg	accaaatccg	ccagaaggcg	ctcgccgccc	agcgatagca	gttcttgcaa	6540
ggaagcaaag	ttttcaacg	gtttgagacc	gtccgcgta	ggcatgctt	tgagcgtttg	6600
accaagcagt	tccaggcggt	cccacagtc	ggtcacctgc	tctacggcat	ctcgatccag	6660
cataatctcct	cgtttgcgg	gttggggcg	ctttcgctgt	acggcagtag	tcgggtctcg	6720
tccagacggg	ccagggtcat	gtcttccac	gggcgcaggg	tcctcgta	cgtagtctgg	6780
gtcacggta	aggggtgcgc	tccgggctgc	gchgctgcc	gggtgcgctt	gaggctggc	6840
ctgcttgtc	tgaagcgctg	ccggcttcg	ccctgcgcgt	cggccaggt	gcatttgacc	6900
atggtgtcat	agtccagccc	ctccgcggcg	tggcccttgg	cgcgcagctt	gccttggag	6960
gaggcgcgc	acgaggggca	gtcagactt	ttgagggcgt	agagcttggg	cgcgagaaat	7020
accgattccg	gggagtaggc	atccgcgcg	caggccccgc	agacggtctc	gcattccacg	7080
agccaggtga	gctctggccg	ttcggggtca	aaaaccagg	ttccccatg	ctttttgatg	7140
cgtttcttac	ctctggttc	catgagccgg	tgtccacgct	cgtgcacgaa	aaggctgtcc	7200
gtgtccccgt	atacagactt	gagaggcctg	tcctcgacc	atgccttga	gagccttcaa	7260
cccagtcagc	tccttcccg	gggcgcgggg	catgactatc	gtcgcgcac	ttatgactgt	7320
cttcttatac	atgcaactcg	taggacaggt	gccggcagcg	ctctgggtca	ttttcggcga	7380
ggaccgcctt	cgctggagcg	cgacgatgat	cggcctgtcg	cttgcggtat	tcggaatctt	7440
gcacgcgc	gctcaagcct	tcgtcactgg	tccgcacc	aaacgtttcg	gcgagaagca	7500
ggccattatac	gccggcatgg	cgccgcacgc	gctgggtac	gtttgctgg	cgttcgcac	7560
gcgaggctgg	atggccttcc	ccattatgat	tcttctcgct	tccggcggca	tcgggatgcc	7620
cgcgttgcag	gccatgctgt	ccaggcaggt	agatgacgac	catcaggac	agcttcaagg	7680
atcgctcgcg	gctttacca	gcctaacttc	gatca	ccgctgatcg	tcacggcgt	7740
ttatggcgc	tcggcgagca	catggaacgg	gttggcatgg	attgttaggc	ccgcctata	7800
ccttgcgtc	ctccccgcgt	tgcgtcgcgg	tgcatggagc	cggccac	cgacctgaat	7860
ggaagccggc	ggcacctcgc	taacggattc	accactccaa	gaattggagc	caatcaattc	7920
ttgcggagaa	ctgtgaatgc	gcaaaccac	ccttggcaga	acatatccat	cgcgtccgac	7980
atctccagca	gccgcacgcg	gchgcatctcg	ggcagcg	ggtcctggcc	acgggtgcgc	8040
atgatcgtgc	tcctgtcg	gaggacccgg	ctaggctggc	gggggtgcct	tactggttag	8100
cagaatgaat	caccgatacg	cgagcgaacg	tgaagcgact	gctgctgaa	aacgtctgcg	8160
acctgagcaa	caacatgaat	ggtctcggt	ttccgtt	cgtaaagtct	gaaaacgcgg	8220
aagtca	cctgcaccat	tatgttccgg	atctgcac	caggatgctg	ctggctaccc	8280
tgtggAACAC	ctacatctgt	attaacgaag	cgctggcatt	gaccctgagt	gattttctc	8340
tggtcccgc	gcatccatac	cgccagttgt	ttaccctcac	aacgttccag	taaccggca	8400
tgttcatcat	cagtaacccg	tatcgtagc	atccctctc	gttcatcgg	tatcattacc	8460
cccatgaaca	gaaattcccc	ttacacgg	ggcatca	gaccaa	acagaaaaac	8520
cccttaacat	ggcccgc	atcagaagcc	agacattaac	gctctggag	aaactcaacg	8580
agctggacgc	ggatgaacag	gcagacatct	gtgaatcg	tcacgacc	gctgatgagc	8640
tttaccgcag	ctgcctcgcg	cgtttgcgt	atgacgg	aaacctctg	cacatgcagc	8700
tcccggagac	ggtcacagct	tgtctgtaa	cggtatgc	gaggac	gcccgtcagg	8760
gcfgcgtc	gggtgttggc	gggtgtcg	gcfgcagcc	gacc	cgtagcgata	8820
gcfggatgt	tactggctt	actatgcggc	atcagag	attgtactg	gagtgcacca	8880
tatgcgtgt	gaaataccgc	acagatgcgt	aaggagaaa	taccgcatc	ggcgcttcc	8940
cgcttcc	ctca	tcgtcg	ggatgc	ggc	cggtatcagc	9000
tcactcaa	ggcgttac	gtt	tcgttcc	ctgcggc	cgag	9060
gtgagcaaaa	ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaa	ggccgttgc	tggcg	9120
ccataggc	cgccccct	acgagcatc	aaaaatcg	cgctca	agagg	9180
aaacccgaca	ggactataaa	gataccaggc	gtt	ggactccc	tcgtgc	9240
tcctgtcc	accctgc	ttacccg	ccgt	ccgttcc	cggt	9300
ggcgcttct	caatgc	gtgt	tcgt	ccgttcc	gggaa	9360
gctgggtgt	gtgc	acgaa	ccccc	ccgtt	ggc	9420
tcgttgc	tccaa	taagac	ccat	ccgt	ggc	9480
caggattac	agagcg	atgt	tcgt	ccgt	ggc	9540
ctacggctac	actaga	agg	tcgt	ccgt	ggc	9600
cggaaaaa	gttgg	tttgc	ccgt	ccgt	ggc	9660
ttttgttgc	aagc	ttac	ccgt	ccgt	ggc	9720
ctttctac	gggt	ccgt	ccgt	ccgt	ggc	9780
gagattatca	aaaagg	atc	ccgt	ccgt	ggc	9840
aatctaa	atata	aggat	ccgt	ccgt	ggc	9900
acctatctca	gcat	tcgt	ccgt	ccgt	ggc	9960
gataactac	atacgg	ccat	ccgt	ccgt	ggc	10020
cccacgc	ccgg	ccat	ccgt	ccgt	ggc	10080
cagaagtgg	cctg	actt	ccgt	ccgt	ggc	10140

tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt	gchgcaacgtt gttgccattg ctgcaggcat	10200
cgtgggtcga cgctcgctcg ttggtatggc	ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag	10260
gcgagttaca tgatccccca tggtgcaaa	aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat	10320
cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt	atcactcatg gttatggcag cactgcataa	10380
ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg	ctttctgtg actggtgagt actcaaccaa	10440
gtcattctga gaatagtgtt	tgccggcacc gagttgtct tgccggcgt caacacggga	10500
taatacccgcc acatcgca gaactttaaa	agtgcgtatc attggaaaac gttcttcggg	10560
gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt	gagatccgt tcgatgtaac ccactcggtc	10620
acccaactga tcttcagcat ctttacttt	caccagcggt tctgggttag caaaaacagg	10680
aaggcaaaat gcccacaaaaa	agggataaag ggcgacacgg aaatgtttag tactcataact	10740
tttcctttt caatattttt	gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat	10800
atttgaatgt atttagaaaaa	ataaaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt	10860
gccacctgac gtctaagaaa	ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgat	10920
cacgaggccc tttcgcttc aagaattctt	atcatgacat taacctataaa aaataggcgat	10980
atcacgaggc ctttcgtca tcatcaataa	tataccttat tttggattga agccaatatg	11040
ataatgaggg ggtggagttt	gtgacgtggc gcggggcggt ggaacggggc gggtagcgt	11100
gtagtgtggc ggaagtgtga	tgttgcagaat gtggcggaac acatgtaaac gccggatgt	11160
gtaaaagtga cgttttttgtt	gtgcggcggt gtatacggga agtgcataatt ttgcgcgg	11220
tttaggcgga tggtagta aattttggcg taaccaagta	atgtttggcc attttcgcgg	11280
gaaaactgaa taagaggaag taaaatctga	ataattctgt gttactcata gcgcgtata	11340
tttgtcttagg gccgcgggga ctggaccgt ttacgtggag	actcgcccg gtgttttct	11400
caggtgtttt ccgcgttccg ggtcaagttt	ggcggttttatt tattatagtc agctctag	11458

```

<210> 3
<211> 11453
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Adenovirales Expressionsplasmid pShuttle.3r.hscIL-12 zur
      regulierten Expression des humanen IL-12 nach Virusgeneration
      mittels AdEasy

<220>
<221> gene
<222> (327)..(713)
<223> VP16

<220>
<221> gene
<222> (714)..(1352)
<223> TetR

<220>
<221> Intron
<222> (1353)..(1912)
<223>

<220>
<221> promoter
<222> (1864)..(1902)
<223> TK-min

<220>
<221> protein_bind
<222> (1913)..(2212)
<223> TetO7

<220>
<221> misc_feature

```

<222> (2213)..(2709)
 <223> CMV-min + Intron

 <220>
 <221> promoter
 <222> (2226)..(2264)
 <223> CMV-min
 <220>
 <221> gene
 <222> (2710)..(4308)
 <223> Humanes singe-chain IL-12

 <220>
 <221> mutation
 <222> (4020)..(4023)
 <223> T/C, A/T, G/C, T/G

 <400> 3

ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccaccc	catccccagc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctccccc	cttgctgtcc	tgccccaccc	caccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtggagtg	180
gcacccctcca	gggtcaaggaa	aggcacgggg	gaggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tgcaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataaggg	300
ccctcttagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcacatcg	360
gtaaacatct	gctcaaactc	gaagtggcc	atatccagag	cgcgttaggg	ggcggagtcg	420
tggggggtaa	atcccgacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcacatgcgc	catgccacg	tcctcgccgt	ctaaagtggag	ctcgcccccc	540
aggctgacat	cgggtgggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccgc	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgcctc	ccccgcctct	tcggggggcgt	cgtcgccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaattgttt	ttcgtagcgc	cgccgctgtta	cgcggaccca	720
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaatccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttgggt	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtaataa	tggccgcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttttctt	ttagcgactt	gatgctcttg	atcttccaat	900
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacacgc	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagtgaa	960
aaaccttgtt	ggcataaaaa	ggctaatttg	tttgcagag	tttcataactg	tttttctgtta	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	ttttgctcca	tcgcgatgac	ttagtaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttc	cagctttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatggtgcc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaaagcccg	cttattttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgcttaca	cctagcttct	gggcgagttt	acgggttgtt	1260
aaaccttcga	ttccgaccc	attaagcagc	tctaattgcgc	tgttaatcac	tttactttta	1320
tctaattctag	agggtctggg	tctcttggc	atggtcgaat	taattcgcgt	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccgggtgg	acctggag	ggacacccgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagccctg	ccacacctca	agcttgacaa	1500
caaaaagatt	gtctttctg	accagatgg	cgcggccacc	ctaaaggca	tcaccgcggg	1560
ccaggtgaat	atcaaattcc	cctcggtttt	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gcccccttt	gagagggagt	actcaccctt	acagtcgaga	ggtttccga	tccggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaaggccct	cgggtggcga	gtaccgttc	gaggccgacg	ggtttccgat	1740
ccaagagatc	tggaaagagcc	gcgaagagtt	tgtcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgcgt	ggtcgctcgg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcbaagtgg	1860
cctcggacc	cgccgc	actgcatttt	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaaactcgac	tttcactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	ggtaaaactcg	acttcaactt	ttctctatca	ctgataggg	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactttc	acttttctct	2100
atcaactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaaactcgac	tttcactttt	ctctatcact	gatagggagt	ggtaaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggaggccct	tataaggcaga	gctcggttt	tgaaccgtca	2280
gatcgccctgg	agacgccc	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
caggcctccgc	ggccccgaat	tgcgaaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gttaaattgc	2400
taacgcagtc	agtgcctctg	acacaacagt	ctcgaaactt	agctgcagaa	gttggtcgt	2460
aggcactggg	caggtaagta	tcaaggttac	aagacaggtt	taaggagacc	aatagaaaact	2520
gggcttgcg	agacagagaa	gactcttg	gcacatttgc	gtcttactg	gatcgatag	2580

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggc	tagcctcgag	aattcacgcg	tggtaccgag	2700
ctcgatcca	tgggtcacca	gcagttggtc	atctcttgg	tttccctgg	ttttctggca	2760
tctccctcg	tggccatatg	ggaactgaag	aaagatgttt	atgtcgtaga	attggattgg	2820
tatccggatg	ccccctggaga	aatgttggtc	ctcacctgt	acacccctga	agaagatgtt	2880
atcacctgga	ccttggacca	gagcagttag	gtcttaggct	ctggcaaaaac	cctgaccatc	2940
caagtcaaag	agtttggaga	tgctggccag	tacacctgtc	acaaaaggagg	cgaggttcta	3000
agccattcgc	tcctgctgct	tcacaaaaag	gaagatggaa	tttggtccac	tgatatttt	3060
aaggaccaga	aagaacccaa	aaataagacc	tttctaagat	gcgaggccaa	gaattattct	3120
ggacgttca	cctgctgggt	gctgacgaca	atcagtactg	atttgacatt	cagtgtcaaa	3180
agcagoagag	gctttctga	cccccaaggg	gtgacgtgcg	gagctgtac	actctctgca	3240
gagagagtca	gagggggacaa	caaggagtat	gagtactcag	tgagtgcc	ggaggacagt	3300
gcctgcccag	ctgctgagga	gagttctgccc	attgaggtca	ttgtggatgc	cgttcacaag	3360
ctcaagtagt	aaaactacac	cagcagctc	ttcatcaggg	acatcatcaa	acctgaccca	3420
cccaacaact	tgcagctgaa	gccattaaag	aattctcgcc	aggtggaggt	cagctgggag	3480
taccctgaca	cctggagtac	tcacattcc	tacttctccc	tgacattctg	cgttcaggtc	3540
cagggcaaga	gcaagagaga	aaagaaaagat	agagtcttca	cgagacaagac	ctcagccacg	3600
gtcatctgcc	gcaaaaatgc	cagcattagc	gtgcggggcc	aggacgcgt	ctatagtctca	3660
tcttggagcg	aatggggcattc	tgtgcctgc	agtgggtggcg	gtggcggcg	atctagaaac	3720
ctccccgtgg	ccactccaga	cccaggaatg	ttcccatgcc	ttcaccactc	ccaaaacctg	3780
ctgagggcccg	tcagcaacat	gctccagaag	gccagacaaa	ctctagaatt	ttacccttgc	3840
acttctgaag	agattgatca	tgaagatatac	acaaaagata	aaaccagcac	agtggaggcc	3900
tgtttaccat	tggaaattaac	caagaatgag	agttgcctaa	attccagaga	gacctcttcc	3960
ataactaatg	ggagttgcct	ggcctccaga	aagaccttctt	ttatgtatggc	cctgtgcctc	4020
tcgagtattt	atgaagactc	gaagatgtac	caggtggagt	tcaagaccat	aatgcaaag	4080
cttctgatgg	atcctaagag	gcagatctt	ctagatcaa	acatgtggc	agttattgtat	4140
gagctgatgc	aggccctgaa	tttcaacagt	gagactgtgc	cacaaaaatc	ctcccttgaa	4200
gaaccggatt	tttataaaac	taaaatcaag	ctctgcatac	ttcttcatgc	tttcagaatt	4260
cgggcagtga	ctattgatag	agtgtgagc	tatctgaatg	ttccctaaaa	agcgaggctg	4320
atccggattt	gtccaaatttgc	ttaaaagacag	gatatacgat	gtccaggctc	tagtttgac	4380
tcaacaatat	caccagctga	agcctataga	gtacgagcca	tagataaaaat	aaaagatttt	4440
atttagtctc	cagaaaaagg	ggggaatgaa	agaccccacc	tgttaggttt	gcaagctagt	4500
aacggccccc	agtgtgctgg	aattctgcag	atatccatca	cactggcgcc	cgctcgagca	4560
tgcatctaga	ggggccttatt	ctatagtgtc	acctaaatgc	tagagctcgc	tgatcagcct	4620
cgactgtgcc	ttctagttgc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctccccctgt	ccttccttgaa	4680
cccttggaaagg	tgccactccc	actgtccctt	cctaataaaa	tgagggaaatt	gcatcgccatt	4740
gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	gtgggggtggg	gcagggacagc	aagggggagg	4800
attggggaga	caatagcagg	catgtgggg	atgcgggtggg	ctctatggct	tctgaggccgg	4860
aaagaaccag	tcgactcgaa	gatctgggcg	tggtaaggg	tggggaaagaa	tatataaggt	4920
gggggtctta	tgtagtttt	tatctgtttt	gcagcagccg	ccgcccctat	gagcaccaac	4980
tcgtttgatg	gaagcattgt	gagctcatat	ttgacaacgc	gcatgcccc	atggggccggg	5040
gtgcgtcaga	atgtgtatggg	ctccagcatt	gatgggtcgcc	ccgtcctgccc	cgaaaactct	5100
actaccttga	cctacgagac	cgtgtctgga	acgcccgttgg	agactgcagc	ctccgccc	5160
gcttcagcccg	ctgcagccac	cgccccgggg	attgtgactg	actttgtttt	cctgagcccg	5220
cttgcagca	gtgcagcttc	ccgttcatcc	gccccgcgt	acaagttgac	ggctttttg	5280
gcacaatttg	atttttgcac	ccgggaactt	aatgtcggtt	ctcagcagct	gttggatctg	5340
cgccagcagg	tttctggccct	gaaggcttcc	tcccctccca	atgcggttta	aaacataaaat	5400
aaaaaaccag	actctgttttgc	gatttgatc	aagcaagtgt	cttgcgtgtct	ttatggatggg	5460
gttttgcgc	cggggtaggc	ccgggaccag	cgtgtctcggt	cgttgagggt	cctgtgttatt	5520
ttttccagga	cgtggtaaaag	gtgactctgg	atgttcagat	acatgggcatt	aagcccgct	5580
ctgggggttgc	ggtagccatca	ctgcagagct	tcatgtcg	gggtgggtgtt	gtagatgtatc	5640
cagtcgtagc	aggagcgctg	ggcgtggtgc	ctaaaaatgt	ctttcagtag	caagctgatt	5700
gccaggggca	ggcccttgg	gtaaagtgttt	acaaaagcggt	taagctggga	tgggtgcata	5760
cgtggggata	tgagatgcatt	cttggactgt	attttaggt	tggctatgtt	cccagccata	5820
tccctccggg	gattcatgtt	gtgcagaacc	accagcacag	tgtatccgg	gcacttggga	5880
aatttgcatt	gtagcttgc	aggaaatgcg	tggagaact	tggagacgccc	cttgcgtact	5940
ccaagatttt	ccatgcattc	gtccataatg	atggcaatgg	gcccacgggc	ggcgccctgg	6000
gogaagatata	ttctggatc	actaacgtca	tagttgtgtt	ccaggatgag	atcgtcatag	6060
gccattttta	caaagcgcgg	gcggagggtg	ccagactgcg	gtataatgg	tccatccggc	6120
ccaggggcgt	agttaccctc	acagatttgc	atttccacg	cttgagttc	agatgggggg	6180
atcatgtctca	cctgcggggc	gatgaagaaa	acgggttccg	gggttagggga	gatcagctgg	6240

gaagaaaagca ggttcctgag cagctgcac ttaccgcgc cggtggccc gtaaatcaca 6300
 cctattaccg ggtgcaactg gtagttaaga gagctgcagc tgccgtcatc cctgaggcagg 6360
 ggggcactt cgtaagcat gtccctgact cgcatgttt ccctgaccaa atccggcaga 6420
 aggcgcgcg cggccagcga tagcagttct tgcaaggaag caaagtttt caacggtttg 6480
 agaccgtccg ccgtaggcat gctttgagc gtttgaccaa gcagttccag gcggtcccc 6540
 agctcggtca cctgctctac ggcacatcgat tccagcatat ctccctcggtt cgcggttgg 6600
 ggcggcttc gctgtacggc agtagtcggt gctcgtccag acggggccagg gtcatgtctt 6660
 tccacgggcg cagggtcctc gtcagcgtag tctgggtcac ggtgaagggg tgccgtccgg 6720
 gctgcgcgt ggccagggtg cgcttgcggc tggtccctgct ggtgctgaag cgctggcgt 6780
 cttcgcctcg cgegtcggcc aggtacatt tgaccatggt gtcatagtcc agccctccg 6840
 cggcgtggcc cttggcgcgc agcttgcct tggaggaggg gccgcacgcg gggcagtgc 6900
 gactttttag ggcgttaggc ttggcgcga gaaataccga ttccggggag taggcattccg 6960
 cggccgcaggc cccgcagacg gtctcgatt ccacgacca ggtgagctct ggccgttcgg 7020
 ggtcaaaaac caggttccc ccatgtttt tgatgcgtt cttacctctg gtttccatga 7080
 gccgggttcc acgctcggtt acgaaaaggc tgcgttgc cccgtatata gacttgagag 7140
 ggagttaaa cgaattcaat agcttgcgtt atggcgcgcg atataaaaatg caaggtgctg 7200
 ctcaaaaaat caggcaaaagc ctcgcgcaaa aaagaaaagca catcgttagtc atgctcatgc 7260
 agataaaaggc agttaagctc cggAACACC acagaaaaag acaccattt tctctcaaac 7320
 atgtctcggtt gtttctgcattt aaacacaaaaaaa taaaataaca aaaaaacatt taaacattag 7380
 aaggcctgtct tacaacagga aaaacaaccc ttataagcat aagacggact acggccatgc 7440
 cggcgtgacc gtaaaaaaaac tggtcaccgt gattaaaaag caccacccgac agctccctgg 7500
 tcatagtccgg agtcataatggta agactcgg taaaacacatc aggttgcattt atcggcgtt 7560
 gctaaaaaggc gaccgaaata gcccggggg atacataccgc gcaaggcgtag agacaacatt 7620
 acagccccca taggaggtat aacaaaatta ataggagaga aaaacacata aacacctgaa 7680
 aaacccctcct gcctaggcaa aatagcaccct tcccgcctca gaacaacata cagcgcttca 7740
 cagcggcgcg ctaacagtca gccttaccag taaaaaagaa aacccatattaa aaaaacacca 7800
 ctcgcacacgg caccagctca atcagtcaca gtgtaaaaaa gggccaagtg cagagcgagt 7860
 atatatagga ctaaaaaatag acgtaacggt taaagtccac aaaaaacacc cagaaaacccg 7920
 cacgcgaacc tacgcccaga aacgaaagcc aaaaaacccca caacttcctc aaatcgctac 7980
 ttcgcgttttccacgttacg taacttccca ttttaagaaa actacaattt ccaacacata 8040
 caagttactc cgccctaaaaa cctacgtcac cccacccccgtt cccacgcggc ggcgcacgtc 8100
 acaaaactcca ccccccattt atcatattgg cttcaatcca aaataaggta tattattgt 8160
 gatgttaatt aacatgcattt gatccatattt cggtgtgaaa taccgcacag atgcgttaagg 8220
 agaaaaatacc gcatcaggcg ctcttcggc tccctcgctca ctgactcgct ggcgtcggtc 8280
 gttcggctgc ggcgagcggtt atcagtcac tcaaaaggcg taatacggtt atccacagaa 8340
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt 8400
 aaaaaggccg cgttgcgtggc gttttccat aggctccggc cccctgacga gcatcaca 8460
 aatcgacgt caagtcaagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt 8520
 ccccccggaa gctccctcggt ggcgtctccct gttccgcaccc tgccgcttac cggataacctg 8580
 tccgcctttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgcgtg taggtatctc 8640
 agttcggtgtt aggtcggttgc ctccaaactcg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 8700
 gaccgctcgcc ccttatccgg taactatcgat cttgagtcac accccggtaag acacgactt 8760
 tcgcccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgtt aggcgggtgt 8820
 acagagtttctc tgaagtgggt gcctaaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtattc 8880
 tgcgtctgc tgaagccagt taccttcggg aaaagagttt gtagctcttgc atccggcaaa 8940
 caaaccacccg ctggtagcggt tggttttttt gtttgcac gtcacccatc gtcacccatc 9000
 aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacggggt ctgacgcgtca gtggaaacaa 9060
 aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaaa ggatcttcac ctatgtcctt 9120
 ttaaattttttt aatgtaaatggtt taaatcaatc taaagtatat atgatgtttt atccggcaaa 9180
 agttaccaat gcttaatcgat tgaggcacct atctcagcga tctgtcttgc tgcgttcatcc 9240
 atagttgcct gactccccgt cgttagata actacgatac gggagggtt accatctggc 9300
 cccagtcgtg caatgatacc ggcgacccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 9360
 aaccagccag ccggaaaggcc cgagcgcaga atggtcgcttgc caactttatc cgcctccatc 9420
 cagtcttattt attgttgcgg ggaagctaga gtaagttagtt cgccagttaa tagtttgcgc 9480
 aacgttggcgtt ccattgtgc agccatgaga ttatcaaaaaa ggatcttcac ctatgtcctt 9540
 ttcacgtaga aagccagtcc gcaaaaaacgg tgctgacccc ggatgaatgtt cagctactgg 9600
 gctatctggc caagggaaaaa cgcaagcgca aagagaaaaggc aggtacgttgc cagttggc 9660
 acatggcgat agctagactg ggcgggttttta tggacagccaa gcaacccggaa attggccagct 9720
 ggggcgcctt ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaaagttt actggatggc tttctcgccg 9780
 ccaaggatct gatggcgccag gggatcaagc tctgtatcaag agacaggatg aggatcggtt 9840
 cgcgtatgg aacaagatgg attgcacgcgca gtttctccgg cgcgttgggtt ggagaggcta 9900

ttcggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgcccgt	gttccggctg	9960
tcagcgcagg	ggcgccccgt	tcttttgtc	aagaccgacc	tgtccggtgtc	cctgaatgaa	10020
ctgcaagacg	aggcagcgcg	gctatcgtag	ctggccacga	cggcggttcc	ttgcgcagct	10080
gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgcggggg	10140
caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctctt	gccgagaaaag	tatccatcat	ggctgatgca	10200
atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccatt	tcgaccacca	agcgaacat	10260
cgcacatcgagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccgggttttgc	tcgatcagga	tgatctggac	10320
gaagagcatc	aggggctcg	gccagccgaa	ctgttcggca	ggctcaaggc	gagcatgccc	10380
gacggcgagg	atctcgctgt	gaccatggc	gatgcctgtc	tgccgaatat	catggtgaa	10440
aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag	10500
gacatagcgt	tggtctaccgc	tgatattgtc	gaagagcttgc	gcggcgaatg	ggctgaccgc	10560
ttcctctgtgc	tttacggtat	cgccgctccc	gattcgccgc	gatcgccctt	ctatcgccctt	10620
cttgcacagt	tcttctgaat	tttgcgttaaa	ttttgtttaa	atcagctcat	tttttaacca	10680
ataggccgaa	atccggcaaca	tccctataa	atcaaaaagaa	tagaccgcga	tagggttgag	10740
tgttgttcca	gtttggaaaca	agagtccact	attaaaagaac	gtggacttca	acgtcaaagg	10800
gcgaaaaacc	gtcttatcagg	gcgatggccc	actacgtgaa	ccatcacccca	aatcaagttt	10860
tttgcgtcg	agtgccgta	aagctctaaa	tcggaaccct	aaagggagcc	cccgatttag	10920
agcttgcacgg	ggaaagccgg	cgaacgtggc	gagaaaggaa	ggaaagaaaag	cgaaaggagc	10980
gggcgcctagg	gcgcgtggca	gtgtagcggt	cacgctgcgc	gtaaccacca	caccgcgcg	11040
cttaatgcgc	cgcgtacagg	cgcgtccatt	cgccatttcag	gatcgaatta	attcttaagt	11100
ttttbtaaca	tcatcaataa	tataccttat	tttggattta	agccaatatg	ataatgaggg	11160
ggtggagttt	gtgacgtggc	gcggggcggt	ggaacggggc	gggtgacgta	gtagtgtggc	11220
ggaagtgtga	tgttgcaga	gtggccgaac	acatgtaa	gacggatgtg	gaaaaagtga	11280
cgtttttgtt	gtgcgcgggt	gtacacagga	agtgacaatt	ttcgccggt	tttaggcgga	11340
tgttgttagta	aatttgggcg	taaccgagta	agatttggcc	atttcgcgg	gaaaactgaa	11400
taagaggaaag	tgaaaatctga	ataattttgt	gttactcata	gcmcgtata	ctg	11453

<210> 4

<211> 9784

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Adenovirales Expressionsplasmid pAd.3r zur regulierten Expression

<220>

<221> gene

<222> (327) .. (713)

<223> VP16

<220>

<221> gene

<222> (714) .. (1352)

<223> TetR

<220>

<221> Intron

<222> (1353) .. (1912)

<223>

<220>

<221> promoter

<222> (1864) .. (1902)

<223> TK-min

<220>

<221> protein_bind

<222> (1913) .. (2212)

<223> TetO7

<220>

<221> misc_feature

<222> (2213)..(2709)

<223> CMV-min + Intron

<220>

<221> promoter

<222> (2226)..(2264)

<223> CMV-min

<220>

<221> multiple cloning site

<222> (2669)..(2770)

<223> NheI, XhoI, KpnI, BamHI, SpeI, EcoRV, NotI, XhoI

<400> 4

ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccacccg	catccccagg	atgcctgcta	60
ttgtctccc	aatcctcccc	cttgctgtcc	tgccccaccc	caccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gagggggcaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcaagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctctagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aagggcacatcg	360
gtaaacatct	gctcaaactc	gaagtcggcc	atatccagag	cgccgttaggg	ggcggagtcg	420
tgggggttaa	atccggacc	cggggaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcacatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgccccc	540
aggctgacat	cggcgggggg	ggccgtggac	agtctgcgcg	tgtgtcccg	ggggagaaaag	600
gacaggcgcg	gagccgcccag	ccccgcctct	tcggggcggt	cgtcgccgg	gagatcgagc	660
aggccctcga	tggtagaccc	gtaatgttt	ttcgtacgcg	cgccgctgt	cgccgacc	720
ctttcacatt	taagtgttt	ttctaattccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780
gctggctctg	caccttgggt	atcaaataat	tgcatacgctt	gtcgtaataaa	tggccgcata	840
ctatcagtag	taggtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgctctt	atcttccaaat	900
acgcaaccta	aagtaaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcat	ataatgcatt	ctctagtgaa	960
aaacctgtt	ggcataaaaaa	ggctaattga	tttgcagag	tttcatactg	ttttctgt	1020
ggccgtgtac	ctaaatgtac	tttgcgttca	tcgcgtatgc	ttagtaaaagc	acatctaaaa	1080
cttttagcgt	tattacgtaa	aaaatcttgc	cagctttccc	cttctaaagg	gcaaaagtga	1140
gtatgggcc	tatctaacat	ctcaatggct	aaggcgtcga	gcaaaagcccc	cttattttt	1200
acatgccaat	acaatgtagg	ctgctctaca	cctagcttct	ggcgagttt	acgggttgtt	1260
aaaccttcga	ttccgacctc	attaagcagc	tctaatgcgc	tgttaatcac	tttactttt	1320
tctaatctag	agggtctggg	tctcttggc	atggtcgaat	taattcgct	cgagccggcc	1380
gcgggtacaa	ttccgggtgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1440
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacacctca	agcttgacaa,	1500
caaaaagatt	gtctttctg	accagatgga	cgccggccacc	ctcaaaggca	tcaccgcgg	1560
ccaggtgaat	atcaaattcct	cctcggtttt	ggaaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620
gccccgtttt	gagagggagt	actcacccca	acatcgaga	ggttttccga	tccggtcgat	1680
gcggactcgc	tcaggtccct	cggtggcgg	gtaccgttcg	gaggccgacg	gtttccgat	1740
ccaagagtac	tggaaagagcc	gcpaaagagtt	tgcctcaac	cgcgagccca	acaggcgtcg	1800
aagcttgcgt	ggtcgctcgg	tgttcgagggc	cacacgcgtc	accttaatat	gcgaagtgg	1860
cctcggaccg	cgccgcccc	actgcacatcg	cgtgttcgaa	ttgcccggcg	agctcgactt	1920
tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	taaactcgac	tttactttt	ctctatcact	1980
gatagggagt	gtttaaactcg	actttactt	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040
cgactttcac	ttttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactt	actttctct	2100
atcaactgata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatcactga	tagggagtgg	2160
taaactcgcac	tttcactttt	ctctatcact	gatagggagt	gtttaaactcg	acggtcgagg	2220
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggaggccta	tataagcaga	gctcggttag	tgaaccgtca	2280
gatcgccctgg	agacgccatc	cacgctgttt	tgacctccat	agaagacacc	gggaccgatc	2340
cagcctccgc	ggcccccgaat	tgcaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gtttaattgc	2400
taacgcagtc	agtgtttctg	acacaacagt	ctcgaactt	agctgcagaa	gttggctgt	2460
aggcacttggg	caggttaagta	tcaaggttac	aagacagggtt	taaggagacc	aatagaaact	2520
gggcttgcg	agacagagaa	gactcttgcg	tttctgata	gcacctattt	gtcttactga	2580

catccacttt	gcctttctct	ccacaggtgt	ccactcccag	ttcaattaca	gctcttaagg	2640
ctagagtact	taatacgact	cactataggc	tagcctcgag	aattcacgag	tggtaccgag	2700
ctcgatcca	ctagtaacgg	ccgcccagtgt	gctggaaattc	tgcagatatac	catcacactg	2760
gccccccgctc	gagcatgcat	ctagagggcc	ctattctata	gtgtcaccta	aatgctagag	2820
ctcgctgatc	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttgtt	tgcccctccc	2880
ccgtgccttc	cttgaccctg	gaagggtgcca	ctcccaactgt	ccttctctaa	taaaaatgagg	2940
aaattgcata	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	gggggggtggg	gtggggcagg	3000
acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgag	gtgggcctca	3060
tggcttctga	ggcggaaaaga	accagtcgac	atcgatgcta	gagtggaagg	tgctgaggta	3120
cgatgagacc	cgcaccaggt	gcagaccctg	cgagtgtggc	ggtaaaacata	ttaggaacca	3180
gcctgtatg	ctggatgtga	ccgaggagct	gaggcccgat	cacttggtgc	tggcctgcac	3240
ccgcgtctag	tttggctcta	gcgatgaaga	tacagattga	ggtactgaaa	tgtgtggcg	3300
tggcttaagg	gtgggaaaaga	atataaagg	tgggggtctt	atgtatgttt	gtatctgttt	3360
tgcagcagcc	gcgcgcgc	tgagcaccaa	ctcgatgtat	ggaagcattt	tgagctcata	3420
tttgacaacg	cgcacgtcccc	catggccgg	ggtgcgtcag	aatgtatgg	gctccagcat	3480
tgtatgtcgc	cccgctctgc	ccgcaaaactc	tactaccttgc	acctacgaga	ccgtgtctgg	3540
aacccgttg	gagactgcag	cctccgcgc	cgatcagcc	gctgcagcca	ccgcccgcgg	3600
gattgtact	gactttgttt	tcctgagccc	gcttgcagc	agtgcagctt	cccgatccatc	3660
cgccccgcgt	gacaagttga	cggcttttt	ggcacaatttgc	gatttttgc	cccgggaaact	3720
taatgtcgtt	tctcagcagc	tgtagatgtt	gcccgcagc	gtttctgccc	tgaaggcttc	3780
ctccccctcc	aatgcgggtt	aaaacataaa	taaaaaacca	gactctgttt	ggattttggat	3840
caagcaagt	tcttgcgttc	tttattttgg	ggttttgcgc	gcccgggtagg	cccgggacca	3900
gcgggtctcg	tccttgagg	tcctgtgtat	ttttttccagg	acgtggtaaa	ggtgactctg	3960
gatgttcaga	tacatggca	taagccgc	tctgggggtgg	agtagcacc	actgcagagc	4020
ttcatgtgc	gggggtgggt	tgttagatgt	ccagtcgtag	caggagcgt	ggcgtgggt	4080
cctaaaaatg	tcttcagta	gcaagctgtat	tgccaggggc	aggcccttgg	tgtaagtgtt	4140
tacaaagcgg	ttaagctggg	atgggtgc	acgtggggat	atagatgca	tcttggactg	4200
tatTTTtagg	ttggctatgt	tcccagccat	atccctccgg	ggattcatgt	tgtcagaac	4260
caccagcaca	gtgtatccgg	tgcacttggg	aaatttgc	tgtagcttag	aaggaaatgc	4320
gtggaaagaa	ttggagacgc	ccttgcgacc	tccaagattt	tccatgcatt	cgtccataat	4380
gatggcaatg	ggcccacggg	cggccgcctg	ggcgaagata	tttctggat	cactaacgtc	4440
atagttgtgt	tccaggatga	gatcgtcata	gcccattttt	acaaagcgc	ggcggagggt	4500
gccagactgc	ggtataatgg	ttccatccgg	cccaggggcg	tagtaccct	cacagatttgc	4560
cattccac	gctttgagtt	cagatgggg	gatcatgtt	acctgcgggg	cgatgaagaa	4620
aacggtttcc	ggggtagggg	agatcagctg	ggaagaaaagc	agttcctga	gcagctgcga	4680
tttaccgcag	ccgggtggcc	cgtaaatcac	acatttacc	gggtgcaact	gttagttaag	4740
agagctgcag	ctgcccgtcat	ccctgagcag	ggggggccact	tcgttaagca	tgtccctgac	4800
tcgcgtt	tccctgacca	aatccgcag	aaggcgtctg	ccgcccagcg	atagcagttc	4860
ttgcaaggaa	gcaaagtttt	tcaacggttt	gagaccgtcc	gccgtaggca	tgcttttgag	4920
cgtttgcacca	agcagttcca	ggcgggtccca	cagctcggtc	acctgtctca	ccgcacatctcg	4980
atccagcata	tctcctcg	tcgcgggtt	ggcgggtt	cgctgtacgg	cagtagtcgg	5040
tgctcggttca	gacggccag	ggtcatgtt	ttccacgggc	gcagggtct	cgtcagcgt	5100
gtctgggtca	cggtgaaggg	gtgcgtctcg	ggctgcgc	tggccagggt	gcttgcagg	5160
ctggctctgc	ttgtgctgaa	gctgtccgg	tcttcgcct	gctgtcg	caggtagcat	5220
ttgaccatgg	tgtcatagtc	cagccctcc	gcccgtgtc	ccttggcg	cagcttgc	5280
ttggaggagg	cgcgcacga	ggggcagtgc	agacttttgc	gggcgttagag	tttggccgc	5340
agaaataccg	atccgggg	gtaggcatttcc	gcccgc	cccccgc	ggtctcgcat	5400
tccacgagcc	aggtgagctc	tggccgttc	gggtcaaaaa	ccaggttcc	cccatgc	5460
ttgatgcgtt	tcttaccttc	ggtttccat	agccgggtgc	cacgcgtgt	gacgaaaagg	5520
ctgtccgtgt	ccccgtatac	agacttgaga	ggcctgtct	cgaccgtgc	ccttgcagagc	5580
tttcaaccca	gtcaagcttcc	tccgggtggc	gccccgc	actatcg	ccgcacttat	5640
gactgttttc	tttatcatgc	aactcgtag	acaggtgc	gcagcgctt	gggtcat	5700
cgccgaggac	cgctttcgct	ggagcgc	gatgatcggc	ctgtcg	ccgtattccg	5760
aatcttgcac	gccctcgctc	aaggccttgc	cacttgtccc	gccaccaa	gttccggcga	5820
gaagcaggcc	attatcgccg	gcatggcgc	cgacgc	ggctacgtt	tgctggcg	5880
cgcgacgcga	ggctggatgg	ccttccccc	tatgatttt	ctcg	ccggcatcg	5940
gatgcccgcg	ttgcaggcca	tgctgtcc	gcaaggtagat	gacgaccatc	agggacagct	6000
tcaaggatcg	ctcgccggc	tttaccgcct	aacttcgatc	actggaccgc	tgatcg	6060
ggcgatttat	ggccgcctcg	cgagcacat	gaacgggtt	gatggattt	taggcgc	6120
cctataccct	gtctgcctcc	ccgcgttgc	tcgcgg	tggagccgg	ccacctcgac	6180
ctgaatgaa	ggccggggca	cctcgtaac	ggattcacca	ctccaa	aggcaat	6240

caattcttgc ggagaactgt gaatgcgcaa accaaccctt ggcaagaacat atccatcgcg 6300
 tccgcacatct ccagcagccg cacgcggcgc atctcgcccga gcgttgggtc ctggccacgg 6360
 gtgcgcatga tcgtgctccgt gtcgttgagg acccggctag gctggcgaaa ttgccttact 6420
 gtttagcaga atgaatcacc gatacgcgag cgaacgtgaa gcgactgctg ctgcaaaacg 6480
 tctgcgcacct gagcaacaac atgaatggtc ttccgttccgt aagtctggaa 6540
 acgcggaaatc cagcgccctg caccattatg ttccggatct gcatcgcagg atgctgctgg 6600
 ctaccctgtg gaacacactac atctgttatta acgaagcgct ggcattgacc ctgagtgatt 6660
 ttctctgtt cccgcccgtt ccataccgccc agttgttac cctcacaacg ttccagtaac 6720
 cgggcgtt catcatcgt aaccctgttac gtgagcatcc tctctcggtt catcggttac 6780
 attacccccca tgaacagaaaa ttccccccta cacggaggca tcaagtgacc aaacaggaaa 6840
 aaaccggccct taacatggcc cgcttatca gaagccagac attaacgctt ctggagaaac 6900
 tcaacgagct ggacgcggat gaacaggcag acatctgtga atcgcttcac gaccacgctg 6960
 atgagcttta cccgcagctgc ctgcgcgtt tcgggtatga cggtgaaaac ctctgacaca 7020
 tgcagctccc ggagacggc acagcttgc tgtaagcgg tgccgggagc agacaagccc 7080
 gtcagggcgc gtcagcggtt gttggcggtt gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta 7140
 gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta tgcggcatca gagcagattt tactgagagt 7200
 gcaccatatg cgggtgtaaaa taccgcacag atgcgttaagg agaaaatacc gcatcaggcg 7260
 ctcttccgct tccctcgctca ctgactcgct ggcgtcggtc gttcggtc gggcagcgg 7320
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcagggata acgcaggaaa 7380
 gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaacccgt aaaaaggccg cggtgctggc 7440
 gttttccat aggctccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcaagag 7500
 gtggcggaaaac cccgcacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gtcctcgt 7560
 gcgctcttctt gttccgaccc tgccgttac cggataccctg tccgccttcc tcccttcggg 7620
 aagcgtggcg ctttctcaat gtcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcggtcg 7680
 ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgtcg ccttattccgg 7740
 taactatcgt cttgagtcac acccggttaag acacgactta tgcgcactgg cagcagccac 7800
 tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggccgggtc acagagttt tgaagtgggt 7860
 gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatac tgcgtctgc tgaagccagt 7920
 taccttcgga aaaaaggtt gtagcttttgc atccggcaaa caaaccacccg ctggtagccg 7980
 tggttttttt gtttgcagc agcagattac ggcgcaaaaaaa aaggatctt aagaagatcc 8040
 tttgatcttt tctacgggggt ctgacgctca gtggAACGAA aactcacgtt aaggatctt 8100
 ggtcatgaga ttatcaaaaaa ggatcttcac ctagatccctt ttaaattttt aatgaagttt 8160
 taaatcaatc taaagtatata atgatcaaa ttgggtctgac agttaccaat gcttaatcag 8220
 tgagggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactcccg 8280
 cgtgtagata actacgatac gggaggcgtt accatctggc cccagtgcgt caatgatacc 8340
 gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccacccag ccggaaaggc 8400
 cgagcgcaga agtggcctg caactttatc cgcctccatc cagtttatacatttttgcgg 8460
 ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc aacgttgcgtt ccattgtc 8520
 aggcatcggt gtagtcacgct cgtcggttgg tatggcttca ttcaagtcgg gttcccaacg 8580
 atcaaggcga gttacatgtat ccccccattttt gtgcaaaaaaaaa gcggttagct ctttcgggtcc 8640
 tccgatcggtt gtcagaagta agttggccgc agtggatctca ctcatggta tggcagca 8700
 gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgttctt tctgtgactg gtgagtaactc 8760
 aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg ggcggccgtt tgctcttgcg cggcgtaac 8820
 acgggataat accgcgcac atagcagaac tttaaaatgtt ctcatcatttgc gaaaacgttc 8880
 ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tggtaaccac 8940
 tcgtgcaccc aactgtatctt cagcatctt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 9000
 aacaggaagg caaatgcgg caaaaaagg aataaggccg acacggaaat gttgaatact 9060
 catactcttc ctttttcaat atttggaaat cattttatcgtt ggttattgtc tcatgagccg 9120
 atacatattt gaatgtatattt agaaaaataa acaaataatgg gttccgcgc catttcccc 9180
 aaaagtgcga cctgacgtct aagaaaaccat tattatcatg acattaaacct ataaaaatag 9240
 gcggtatcag aggcccttccgtt cgttcaaga attcttacatc tgacattaaac ctataaaaat 9300
 aggcgatatac cggcccttccgtt cgttcaatc caataatata ctttatttttgc gattgaagcc 9360
 aatatgataa tgaggggggtt gagtttgcgtt cgtggcgcgg ggcgtggaa cggggcgggt 9420
 gacgttagtag tggcgccaa gttgtatgtt gcaagtgtgg cggaaacacat gtaagcgccg 9480
 gatgtggtaa aagtgcgtt ttgggtgtgc gccgggttat acgggaagtg acaattttcg 9540
 cgcgggttttta ggcggatgtt gtagtaaatt tggcgtaac caagtaatgt ttggccatt 9600
 tcgcggaaa actgaataag aggaagtgaa atctgaataa ttctgtgttca ctcatagcgc 9660
 gtaatatttgc tctaggccg cggggactttt gaccgttac gtggagactc gcccaggtgt 9720
 ttttctcagg tggggccgc gttccgggttca aagttggcg ttttattttt atagtcagct 9780
 ctag 9784

<210> 5
 <211> 9668
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Expressionsplasmid pShuttle.3r zur regulierten Expression nach Virusgeneration mittels AdEasy

<220>
 <221> gene
 <222> (327)..(713)
 <223> VP16

<220>
 <221> gene
 <222> (714)..(1352)
 <223> TetR

<220>
 <221> Intron
 <222> (1353)..(1912)
 <223>

<220>
 <221> promoter
 <222> (1864)..(1902)
 <223> TK-min

<220>
 <221> protein_bind
 <222> (1913)..(2212)
 <223> TetO7

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2213)..(2709)
 <223> CMV-min + Intron

<220>
 <221> promoter
 <222> (2226)..(2264)
 <223> CMV-min

<220>
 <221> multiple cloning site
 <222> (2669)..(2770)
 <223> NheI, XhoI, KpnI, SpeI, EcoRV, NotI, XbaI

<400> 5

ctgctggttc	tttccgcctc	agaagccata	gagcccacccg	catccccaggc	atgcctgcta	60
ttgtcttccc	aatcctccccc	cttgctgtcc	tgc(ccc)acccc	cacccccccag	aatagaatga	120
cacctactca	gacaatgcga	tgcaatttcc	tcattttatt	aggaaaggac	agtgggagtg	180
gcaccccttcca	gggtcaagga	aggcacgggg	gaggggcaaaa	caacagatgg	ctggcaacta	240
gaaggcacag	tcgaggctga	tcagcgagct	ctagcattta	ggtgacacta	tagaataggg	300
ccctcttagga	tcgatcctcg	cgccccctac	ccaccgtact	cgtcaattcc	aaggggcatcg	360
gtaaaacatct	gctcaaactc	gaagtccggcc	atatccagag	cggcgtaggg	ggcggagatcg	420
tggggggtaa	atcccgacc	cggggaaatcc	ccgtccccca	acatgtccag	atcgaaatcg	480
tctagcgcgt	cggcatgcgc	catcgccacg	tcctcgccgt	ctaagtggag	ctcgcccccc	540
aggctgacat	cggtcgggggg	ggccgtcgat	agtctgcgcg	tgtgtcccgc	ggggagaaaag	600

gacaggcgcg	gagccgccag	ccccgcctct	tcggggcggt	cgtcgccgg	gagatcgagc	660	
aggccctcga	tggtagaccc	gtattttt	ttcgtaacgcg	cgcggctgta	cgcggaccga	720	
ctttcacatt	taagttgttt	ttctaatccg	catatgatca	attcaaggcc	gaataagaag	780	
gctggctctg	cacctggtg	atcaaataat	tcgatagctt	gtcgtaataa	tggcggcata	840	
ctatcagtag	tagtgtttc	cctttcttct	ttagcgactt	gatgcttgc	atcttccaat	900	
acgcaaccta	aagtaaaatg	ccccacagcg	ctgagtgcata	ataacgcgtt	ctctagtgaa	960	
aaaccttgtt	ggcataaaaaa	ggctaaattga	tttcgagag	tttcatactg	tttttctgta	1020	
ggccgtgtat	ctgaatgtac	ttttgcctca	ttgcgatgac	tttagaaagc	acatctaaaa	1080	
cttttagcgt	tattgcgtaa	aaaatcttgc	cagcttccc	ctttaaagg	gcaaaagtga	1140	
gtatggtgc	tatctaaca	ctcaatggct	aaggcgctga	gcaaagccc	cttattttt	1200	
acatgccaat	acagtgtagg	ctgctctaca	ccaagcttct	gggcgagttt	acgggttgc	1260	
aaaccttgc	ttccgacctc	attaagcagc	tctaattgcgc	tgtaatcac	tttactttt	1320	
tctaattctag	agggtctggg	tctcttggc	atggtcgaat	taattcgct	cgagccggcc	1380	
gccccgtacaa	ttccgggttgg	acctgggagt	ggacacctgt	ggagagaaaag	gcaaaagtgg	1440	
tgtcattgtc	actcaagtgt	atggccagat	ctcaagcctg	ccacaccta	agcttgacaa	1500	
caaaaagatt	gtctttctg	accagatgga	cgcggccacc	ctcaaaaggca	tcaccgggg	1560	
ccaggtgaat	atcaaattct	cctcgcccc	ggaaactgac	aatcttagcg	cagaagtcat	1620	
gccccgttt	gagagggagt	actcacccca	acagtcgaga	ggtttccga	tccggtcgat	1680	
gcggactcgc	tcaggtccct	cgggtggcga	gtaccgttc	gaggccgacg	ggtttccgat	1740	
ccaagagtagc	tggaaaagacc	gCGAAGAGTT	tgtcctcaac	cgcgagccc	acaggcgtcg	1800	
aagcttgatg	ggtcgctcg	tgttcgaggc	cacacgcgtc	acctaataat	gcaagtgga	1860	
cctcggaccc	cgccgcccc	actgcac	cgtgttgc	ttgcccggcg	agctcgactt	1920	
tcactttct	ctatca	tagggagtgg	taaactcgac	tttca	ctctatcact	1980	
gatagggagt	ggtaaaactcg	actttca	ttctctatca	ctgataggga	gtggtaaact	2040	
cgactttcac	tttctctat	cactgatagg	gagtggtaaa	ctcgactt	actttctct	2100	
atca	actgtata	gggagtggta	aactcgactt	tcactttct	ctatca	tagggagtg	2160
taaaactcgac	tttca	ctctatca	ctctatca	gatagggagt	ggttaaactcg	2220	
gtcgagtagg	cgtgtacgg	gggaggccta	tataagcaga	gctcg	tttagtca	2280	
gatgccttgg	agacgccc	cacgctgtt	tgac	cttccat	agaagacacc	2340	
cagcctccgc	ggccccgaat	tgcgaagctt	tattgcggta	gtttatcaca	gtttaattgc	2400	
taacgcagtc	agtgttctg	acacaacagt	ctcgaactt	agctgcagaa	gttggcgtg	2460	
aggcacttgg	caggtaagta	tcaagg	tttctgtac	aa	taaggagacc	2520	
gggcttgc	agacagagaa	gactctgcg	tttctgtat	gcac	tttgcgt	2580	
catccactt	gccttctct	ccacaggtgt	ccactccca	ttcaattaca	gctttaagg	2640	
ctagagtact	taatacgact	cactataggc	tagcctcgag	aattcacg	tggtaccgag	2700	
ctcgatcca	ctagtaacgg	ccgccc	gtcggaaattc	tgca	gatatac	2760	
gccccgc	gagcatgc	ctagagg	ctattctata	gtgtcac	aatgttagag	2820	
ctcgctgatc	agcctcgact	gtgc	tttgc	atctgtt	tttgc	2880	
ccgtgc	cttgaccctg	gaagg	cc	tttgc	taaaatgagg	2940	
aaattgc	gcattgtctg	agttaggt	attctattt	gggggg	gtggggcagg	3000	
acagcaaggg	ggaggat	gaagacaata	gcagg	ttgggat	gtgggctcta	3060	
tggcttctga	ggcgaaaga	accagtc	tcgaagatct	gggcgtgg	aaagggtgg	3120	
aagaatata	aagg	tcttat	tttgc	tttgc	agccgccc	3180	
gccatgagca	ccaactcg	tgtggaa	attgtgagct	catatttgc	aacgcgc	3240	
ccccatggg	ccgggt	tcagaatgt	atgggc	gcattgtat	tcgcccc	3300	
ctgccc	actctactac	ttgac	cttgc	atctgtt	tttgc	3360	
gcagc	ccggc	gagaccgt	gac	tttgc	tttgc	3420	
gtctt	ctg	agccg	cc	tttgc	tttgc	3480	
gtt	ctg	aagcag	gtt	catcc	cccg	3540	
ttg	acgg	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	3600	
cag	gtt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	3660	
gtt	aaa	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	3720	
tgt	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	3780	
agg	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	3840	
ggcata	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	3900	
cgt	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	3960	
gtt	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	4020	
atgt	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	4080	
ccgg	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	4140	
actt	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	4200	
ccgg	ttt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	4260	

atgagatcgatcataggccat ttttacaaaag cgccccggga ggggccaga ctgcggata 4320
 atggttccat cccggcccagg ggcgttagtta ccctcacaga tttcatttc ccacgcgg 4380
 agttcagatg gggggatcat gtctacctgc ggggcgtatga agaaaacggt ttccgggta 4440
 ggggagatca gctgggaaga aagcagggttc ctgagcagct gcacttacc gcagccgg 4500
 gggccgtaaa tcacacctat taccgggtgc aactggtagt taagagagct gcagctgccc 4560
 tcatccctga gcaggggggc cacttcgtta agcatgtccc tgactcgcat gtttccctg 4620
 accaaatccg ccagaaggcg ctgcgcgccc agcgatagca gttcttgcaa ggaagcaaag 4680
 ttttcaacg gtttgagacc gtccgcccgt ggcgtatgtt tgagcgttt accaagcagt 4740
 tccaggcggt cccacagctc ggtcacctgc tctacggcat ctcgtatccag catatctcct 4800
 cgtttccggg gttggggcggt ctttcgtgt acggcagtag tcgggtctcg tccagacggg 4860
 ccagggcat gtctttccac gggcgccaggg tcctcgtag cgtatgttgc gtcacgtga 4920
 aggggtgcgc tccgggctgc ggcgtggcca ggggtgcgtt gaggctggtc ctgctgtgc 4980
 tgaagcgctg ccggtcttcg ccctgcgcgt cggccaggta gcatttgacc atgggtcat 5040
 agtccagccc ctccgcggcg tggcccttgg cgccgcgtt gcccttggag gaggcggcgc 5100
 acgagggca gtgcagactt ttgagggcggt agagcttgg cgccgagaaat accgattccg 5160
 gggagtaggc atccgcggc caggccccgc agacggcttc gcattccacg agccaggtga 5220
 gctctggccg ttcgggggtca aaaaccaggta ttccccatg ctttttgatg cgtttcttac 5280
 ctctgggttc catgagccgg tgcgttccatc cgggtacgaa aaggtgtcc gtgtccccgt 5340
 atacagactt gagagggagt ttaaacgaat tcaatagctt gttgcattgg cggcgatata 5400
 aaatgcagg tgcgtctcaa aaaatcaggc aaagcctcgc gcaaaaaaaga aagcacatcg 5460
 tagtcgtct catgcagata aaggcaggta agtcgggaa ccaccacaga aaaagacacc 5520
 atttttcttcaaacatgtc tgccgggttc tgcataaaaca caaaataaaaaa taacaaaaaaaa 5580
 acatTTTAAAC attagaagcc tgcgttccatc caggaaaaac aacccttata agcataagac 5640
 ggactacggc catgcggcg tgaccgtaaa aaaactggtc accgtgatta aaaagcacca 5700
 ccgacagctc ctccgtcatg tccggagtca taatgtaaag ctcggtaaac acatcagggtt 5760
 gattcatcggt ctagtgtctaa aaagcgaccg aatagcccg ggggaataca taccgcagg 5820
 cgtagagaca acattacagc ccccatagga ggtataacaa aattaatagg agagaaaaac 5880
 acataaaacac ctgaaaaacc ctccgtctaa ggcggggatcc caccctcccg ctccagaaca 5940
 acatacagcg ctccacagcg gcagcctaacc agtcggccctt accagtaaaa aagaaaaacct 6000
 attaaaaaaaaa caccactcga cacggcaccat gtcataatcg tcacagtgtaa aaaaaggccc 6060
 aagtgcagag cgagtatata taggactaaa aaatgacgtt acgggtttaaag tccacaaaaaaaa 6120
 acacccagaa aaccgcacgc gaacctacgc ccagaaacga aagccaaaaa accccacaact 6180
 tcctcaaatc gtcacttccg ttttccacg ttacgttaact tcccatatata agaaaaactac 6240
 aattcccaac acatacaagt tactccggcc taaaacctac gtcacccgc cccgttccac 6300
 gccccgcgccc acgtcacaaa ctccacccccc tcattatcat attggcttca atccaaataa 6360
 aggttatata ttgatgtatgt taattaacat gcatggatcc atatgcgggt tgaaataccg 6420
 cacagatgcg taaggagaaaa ataccgcattc aggccgttcc cgcgttccctc gtcactgac 6480
 tcgctgcgct cggtcggtcg gctgcggcg ggcgtatcg ctcactcaaa ggcggtaata 6540
 cggttatcca cagaatcagg ggataacgc gaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa 6600
 aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcggtt tccataggct cccggccct 6660
 gacgagcatc aaaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgc accactataa 6720
 agataccagg cggttccccc tggaaagctcc ctgcgtgcgtt ctcgttcc gaccctgcg 6780
 cttaccggat acgtgtccgc ctttctccct tcggggaaagcg tggcggttcc tcatagctca 6840
 cgctgttaggt atctcgttccg ggtgttaggtc gtgcgttccaa agctgggtcg tgcacgaa 6900
 ccccccgttc agccgcaccg ctgcgttcc tccggtaact atcgttccat gtcaccccg 6960
 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gcaactggta acaggattag cagagcgagg 7020
 tatgttaggcg gtgcgtacaga gttcttgaag tgggtggccata actacggcta cactagaagg 7080
 acagtatttgc gatatctgcgc tctgcgttccg ccagttaccc tcggaaaaag agttggtagc 7140
 tcttgcgttccg gcaaacaac caccgcgttcc agccgttccgtt ttttgcgttcc caagcagcag 7200
 attacgcgcgca gaaaaaaaagg atctcaagaa gatccttgc tctttctac ggggtctgac 7260
 gtcagtgga acgaaaaactc acgtttaagggtt attttggtca tgagattatc aaaaaggatc 7320
 ttcacctaga tcctttttaaa ttaaaaaatgtt agttttaaat caatctaaag tatatatgtt 7380
 taaaacttgggt ctgcacagttt ccaatgcgtt atcgttgcggg cacctatctc agcgatctgt 7440
 ctatccgtt catccatagt tgccgtactc cccgtcggtt agataactac gatacgggag 7500
 ggcttaccat ctggccccagg tgctgcgttcc ataccgcgtt accccacgc accggctccaa 7560
 gatttacatcg caataaaacca gcaacccggaa agggccggatc gcagaagttcc tccgtcaact 7620
 ttatccgcctt ccattccatgtt tattatgtt tgccggggaaat ctgcgttccat tagttcgcca 7680
 gttaatagtt tgccgttccatc gtcgttccatc tgagattatc aaaaaggatc 7740
 ttcacctaga tccttttcaat gtagaaagcc agtccgcaga aacgggtctg accccggatc 7800
 aatgtcgtt actgggctat ctggacacagg gaaaacgcggaa gcaacccggaa aaagcaggtt 7860
 gcttgcgtt ggcttacatg gtcgttccatc gactggggggg ttttgcgttcc caagcagcag 7920

ccggaaattgc	cagctggggc	gccctctgg	aaggttggga	agccctgcaa	agtaaactgg	7980
atggctttct	cggcgccaag	gatctgatgg	cgcaggggat	caagctctga	tcaagagaca	8040
ggatgaggat	cgttgcac	gattgaacaa	gatggatgc	acgcagggtc	tccggccgct	8100
tggttgaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	8160
ggcgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	8220
ggtgcctga	atgaactgca	agacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	8280
gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgc	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	8340
ggcgaagtgc	cggggcagga	tctccgtca	tctcacctt	ctctgcccga	gaaagtatcc	8400
atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgate	cggctacctg	cccattcgac	8460
caccaagcga	aacatcgcat	cgagcggagca	cgtactcgga	tggaaagccgg	tcttgtcgat	8520
caggatgatc	tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcccgag	ccgaactgtt	cgccaggctc	8580
aaggcgagca	tggccgacgg	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	ctgcttcccg	8640
aatatcatgg	tgaaaaatgg	ccgctttct	ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	8700
gcggaccgc	atcaggacat	agcgttggct	accctgtata	ttgctgaaga	gcttggccgc	8760
gaatgggctg	accgcttcc	cgtgtttac	ggtatcgccg	ctcccgattc	gcagcgcattc	8820
gccttctatc	gccttcttga	cgagttctc	tgaattttgt	taaaattttt	gttaaatcag	8880
ctcattttt	aaccaatagg	ccgaaatcg	caacatccct	tataaatcaa	aagaatagac	8940
cgcgataggg	tttagtgtt	ttccagttt	gaacaagagt	ccactattaa	agaacgtgga	9000
ctccaacgtc	aaaggcgcga	aaaccgtcta	tcagggcgat	ggcccactac	gtgaaccatc	9060
acccaaatca	agtttttgc	ggtcgagg	ccgtaaagct	ctaaatcgga	accctaaagg	9120
gagcccccg	tttagagctt	gacggggaaa	gccggcgaac	gtggcgagaa	aggaagggaa	9180
gaaagcgaaa	ggagcgggc	ctagggcgct	ggcaagtgt	gcccgtacgc	tgcgcgtaac	9240
caccacaccc	gcfgcgtt	tgcgccc	cagggcgcgt	ccattcgcca	ttcaggatcg	9300
aattaattct	taagttttt	taacatcatc	aataatatac	cttattttgg	attgaagcca	9360
atatgataat	gaggggggtgg	agtttgtgac	gtggcgccgg	gcgtggaaac	ggggcgggtg	9420
acgttagtagt	gtggcggaaag	tgtgttgtt	caagtgtggc	ggaacacatg	taagcgacgg	9480
atgtggcaaa	agtgcacgtt	tttgtgtgc	ccggtgtaca	caggaagtga	caattttcgc	9540
gcggttttag	gccccatgtt	tagtaaattt	gggcgtaaacc	gagtaagatt	tggccatttt	9600
cgccggaaaa	ctgaataaga	ggaagtgaaa	tctgaataat	tttgtgttac	tcatagcg	9660
taatactg						9668

Patentansprüche

1. Rekombinanter viraler Vektor, der ein Insert enthält, das die allgemeine Struktur

tTA - Intron¹ - TK⁺ - TetO, - CMV⁺ - Intron² - Transgen

aufweist, wobei

TetO, der heptamerisierte Tetracylin-Operator ist,
TK⁺ der minimale Thymidin Kinase-Promotor ist,
tTA eine Nukleinsäuresequenz ist, die für ein Fusionsprotein aus dem durch Tetracyclin induzierbaren Repressorprotein und der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 kodiert,
CMV⁺ der minimale Cytomegalievirus-Promotor ist und
Transgen eine für ein nicht-virales Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ist,
Intron¹ eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist und
Intron² eine beliebige nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz mit einer Länge von 0 bis etwa 1000 bp ist.

2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert in umgekehrter Orientierung in das virale Vektorgenom inseriert ist.

3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionen von tTA und Transgen im Insert vertauscht sind.
4. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Insert zwischen 'CMV' und 'Intron²' oder zwischen 'Intron²' und 'Transgen' zusätzlich einen lac-Repressor (lacR) enthält.
5. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Transgen eine für ein Fluoreszenzprotein, für Luciferase, Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-2 (IL-2); Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α) oder Interferon-γ (IFN-γ) kodierende Nukleinsäuresequenz ist.
6. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß IL-12 ein single-chain Interleukin-12 ist.
7. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus, ein Adenoassoziiertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus ist.
8. Vektor nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Insert in die E1- und/oder die E3-Region eines rekombinanten Adenovirus einkloniert ist.
9. Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß er durch homologe Rekombination eines

viralen Plasmids und eines Expressionsplasmids mit der in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 oder SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz erhältlich ist.

10. Expressionsplasmid mit der in SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 dargestellten Nukleinsäuresequenz.
11. Verwendung eines Plasmids nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Vektors nach den Ansprüchen 1 bis 9.
12. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9 zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien.
13. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein therapeutisch wirksames Protein kodiert, in der Gentherapie.
14. Verwendung nach Anspruch 13, bei dem das Transgen IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α oder IFN- γ ist, zur Gentherapie maligner Erkrankungen.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die maligne Erkrankung ein solider Tumor ist.
16. Verwendung nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass man die Genexpression mit Doxycyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin, reguliert.
17. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, bei denen 'Transgen' für ein Reporterprotein kodiert, zum Nachweis von Tetracyclin oder einem Derivat desselben in

biologischen, lebensmittelchemischen oder ähnlichen Proben.

18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Derivat Doxycyclin ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft rekombinante virale Vektoren, die durch Tetracyclin oder Tetracyclin-Derivate, wie z.B. Doxycyclin, hocheffizient supprimiert werden können, sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in Eukaryontenzellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

Figure 1

Tet-OFF system

Blocketal.2002

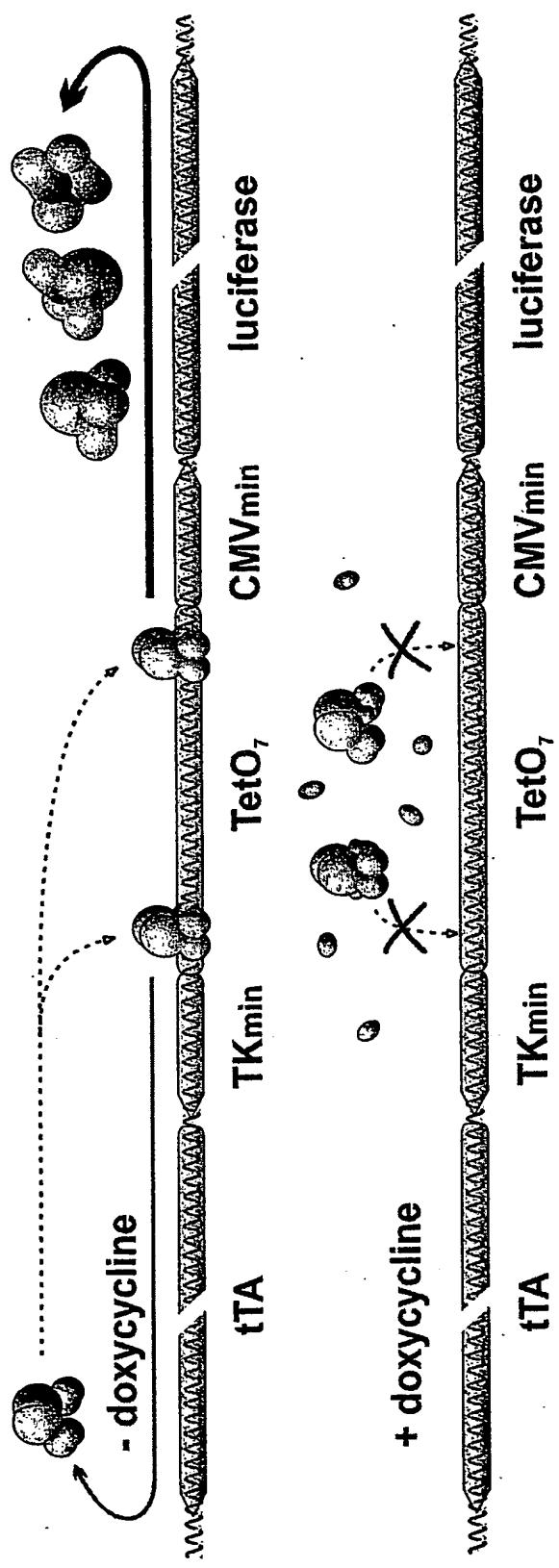
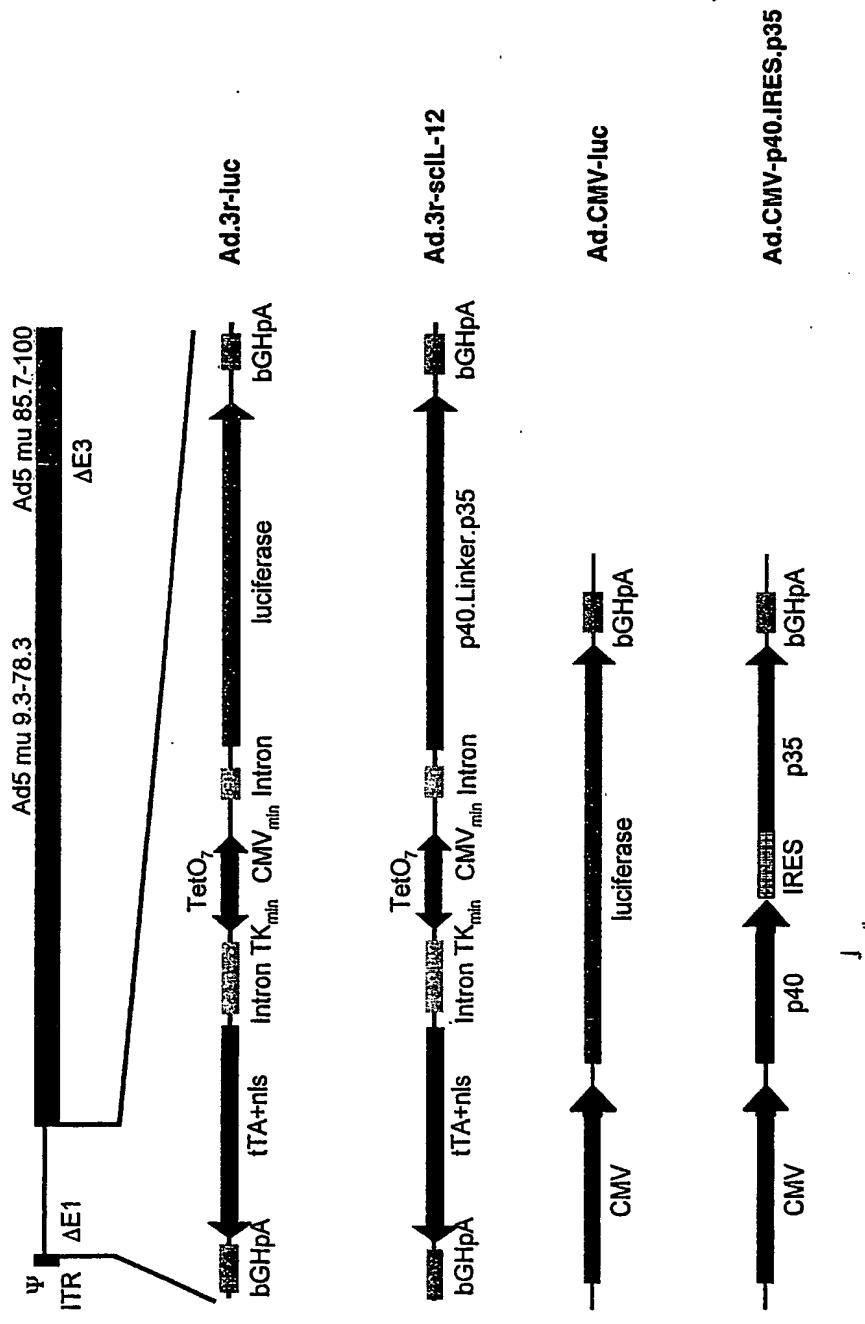


Figure 2



Block et al. 2002

Figure 3

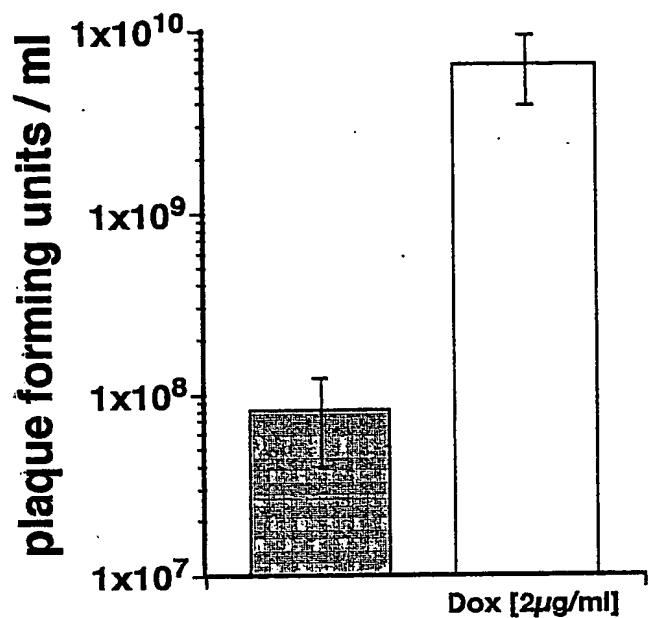


Figure 4

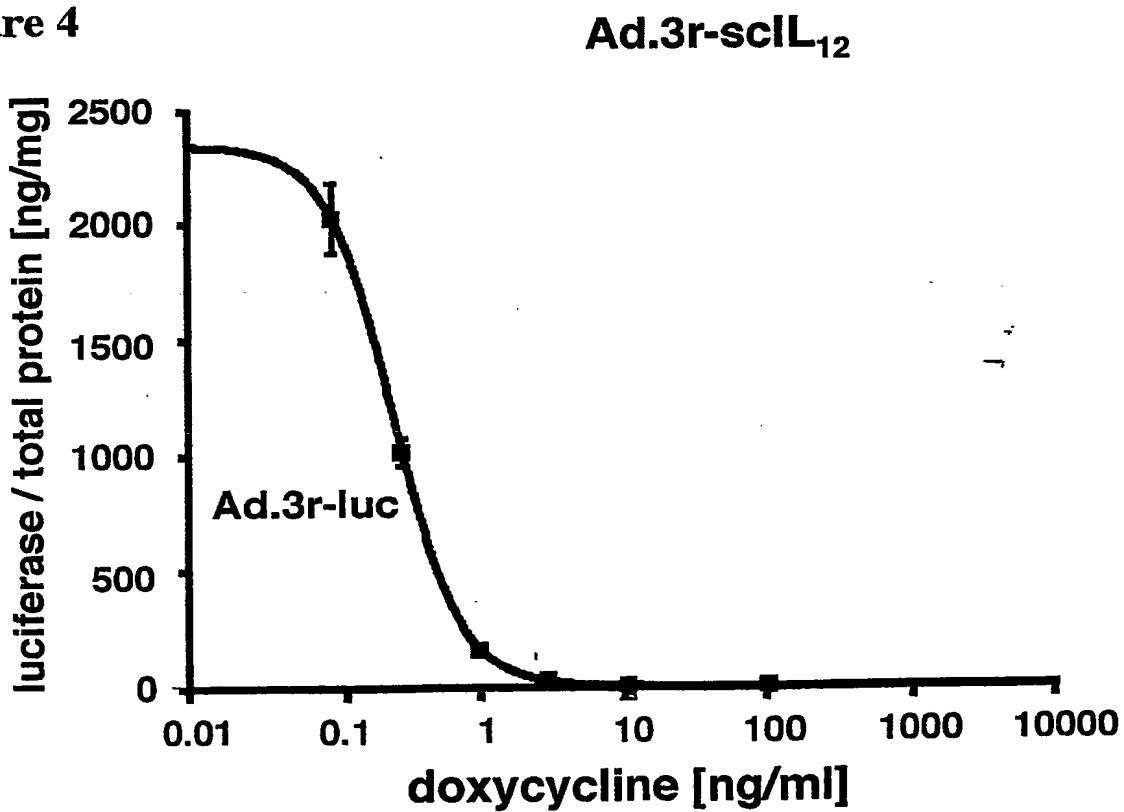


Figure5

Ad.3r-luc

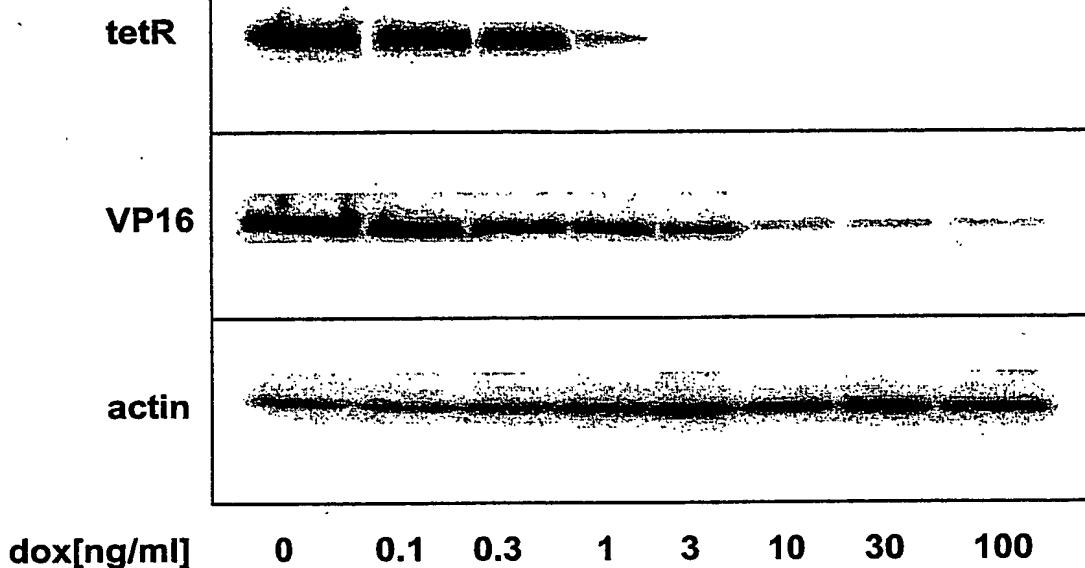


Figure6

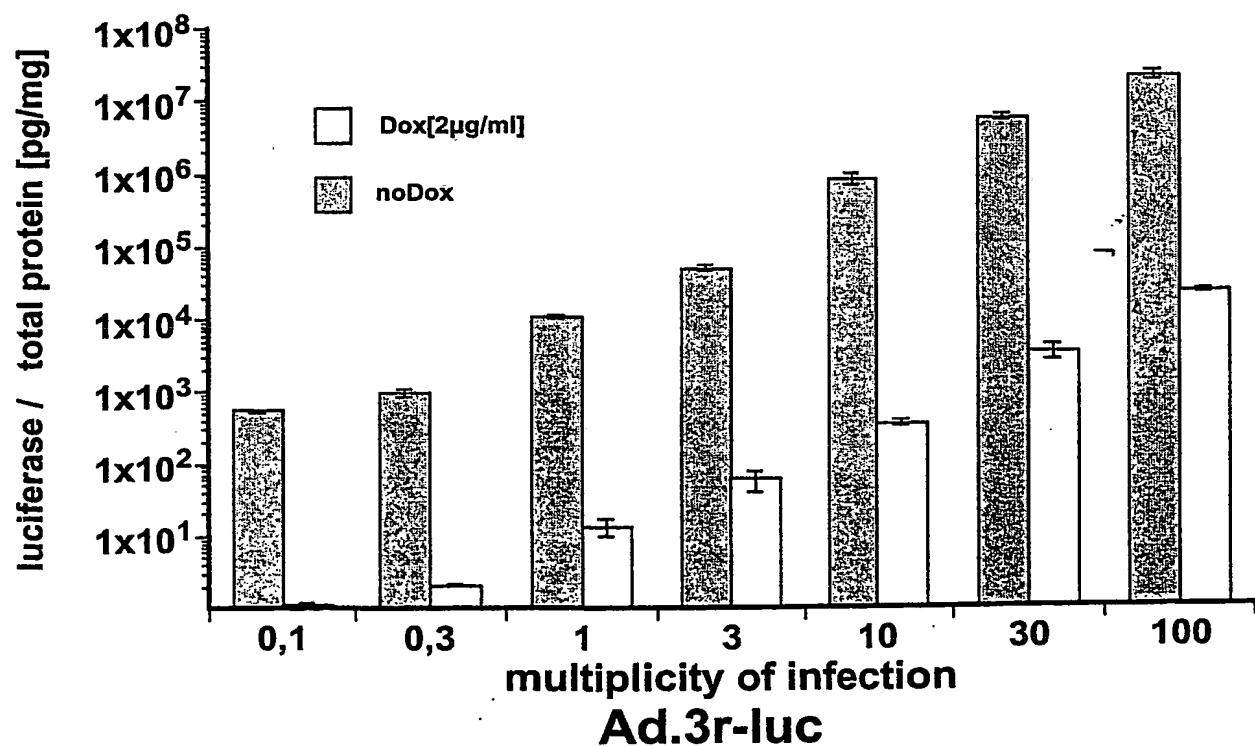


Figure7

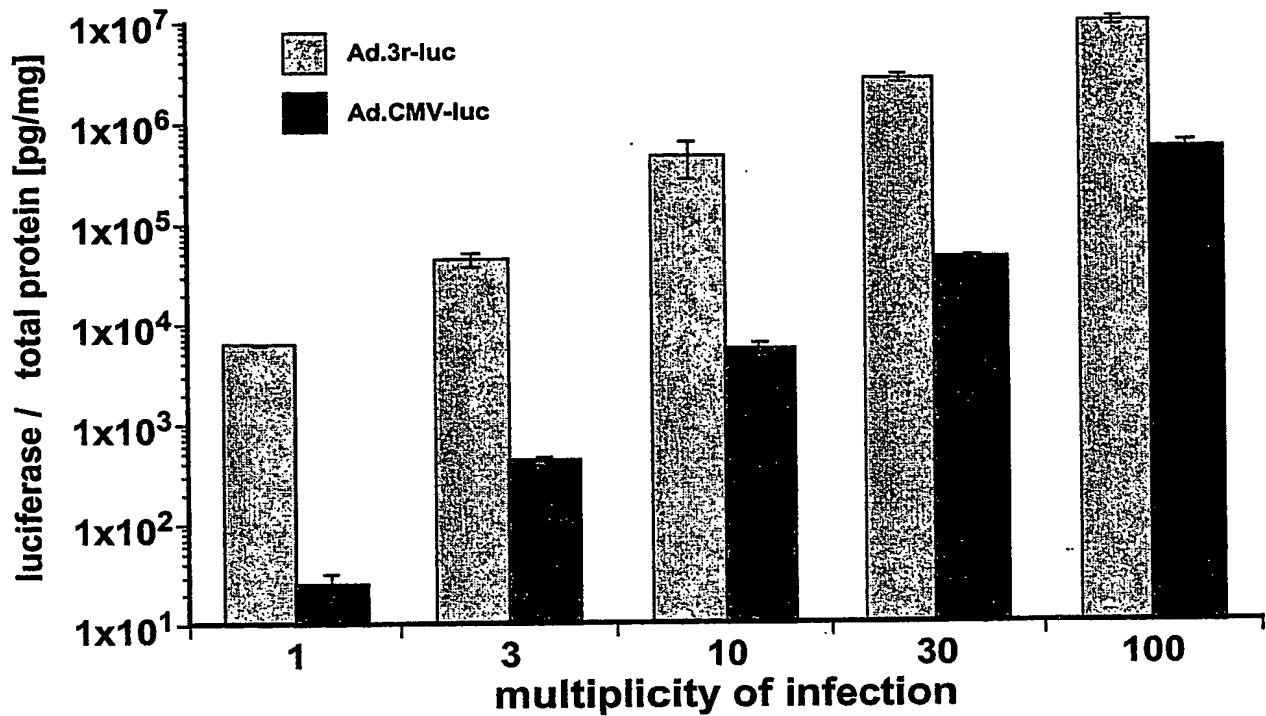
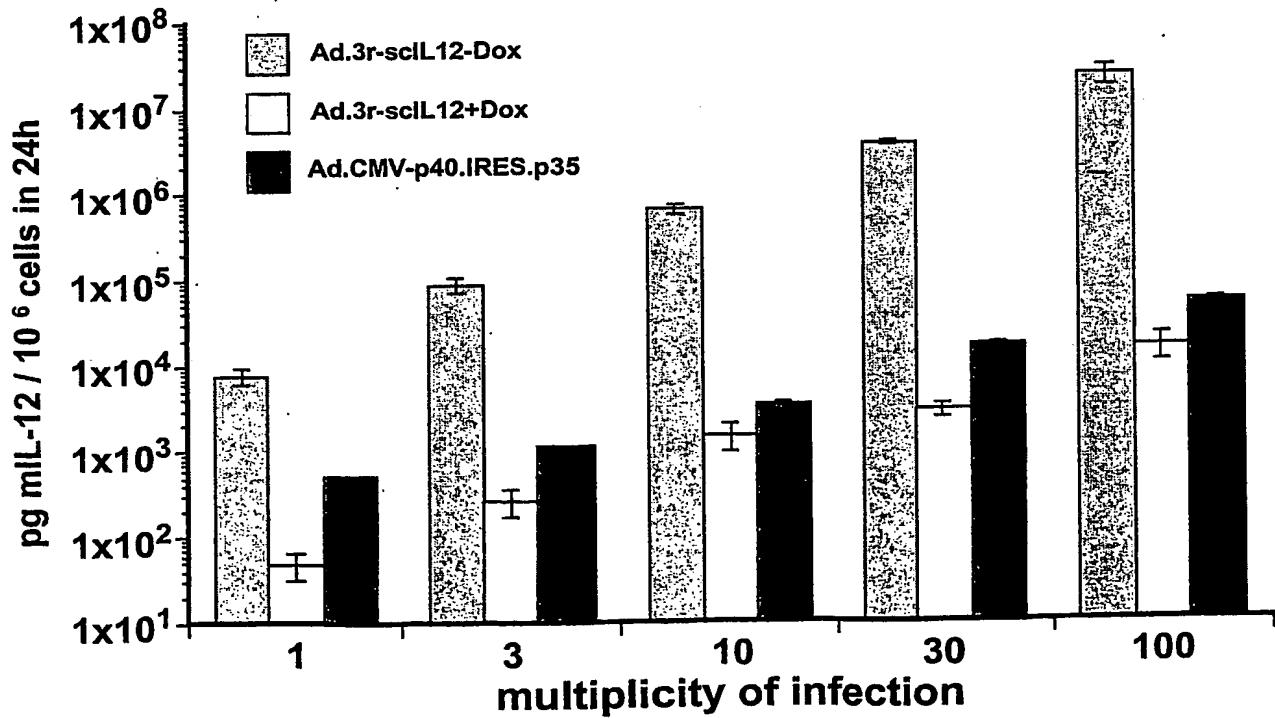


Figure8



Blocketal.2002

Figure9

Ad.3r-scIL12

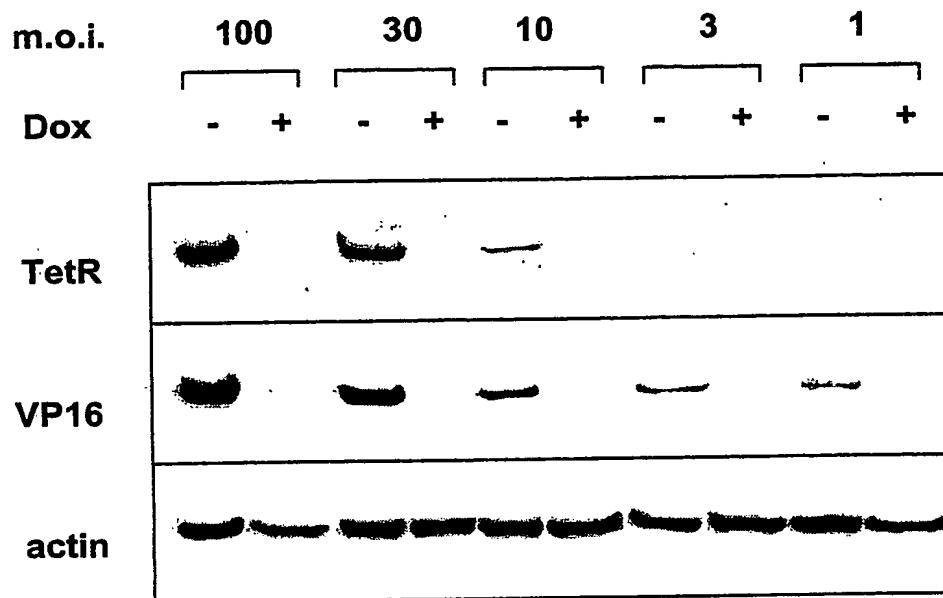


Figure10

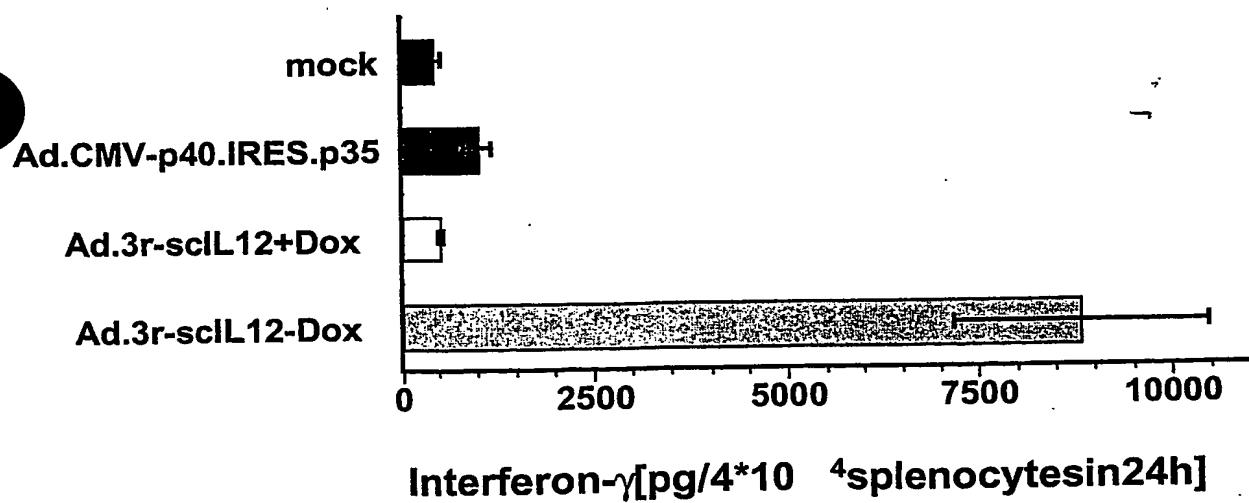


Figure 11

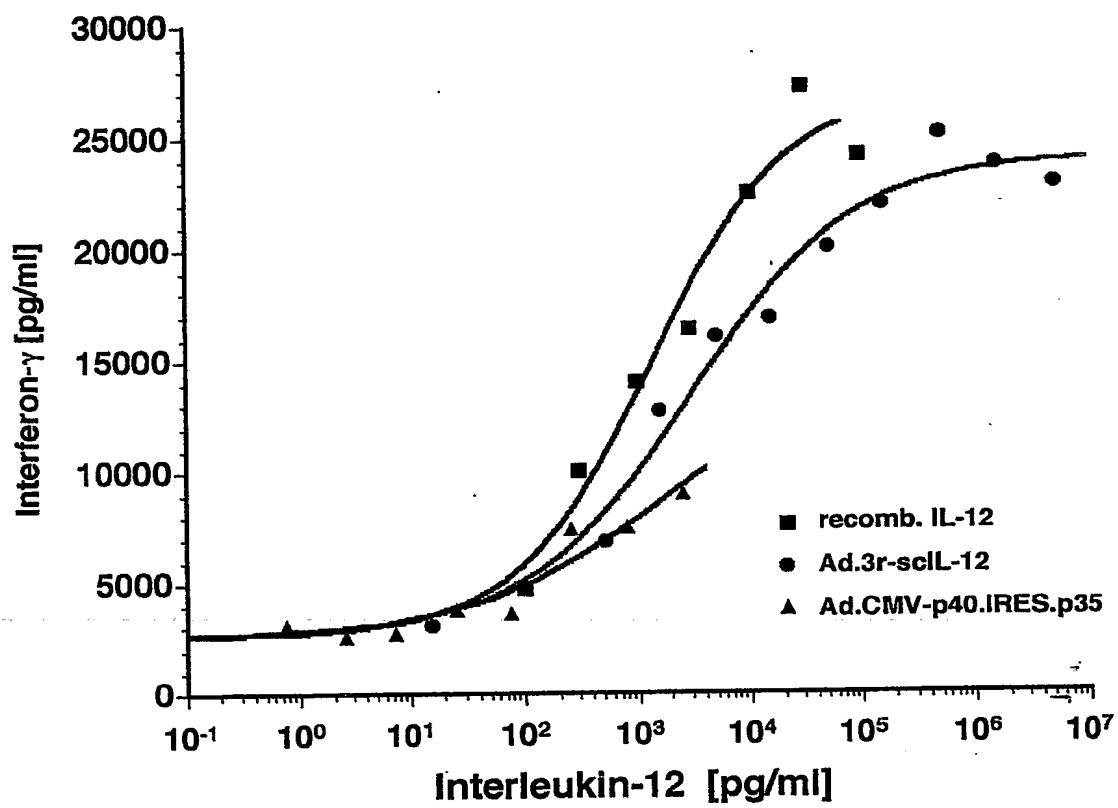


Figure12

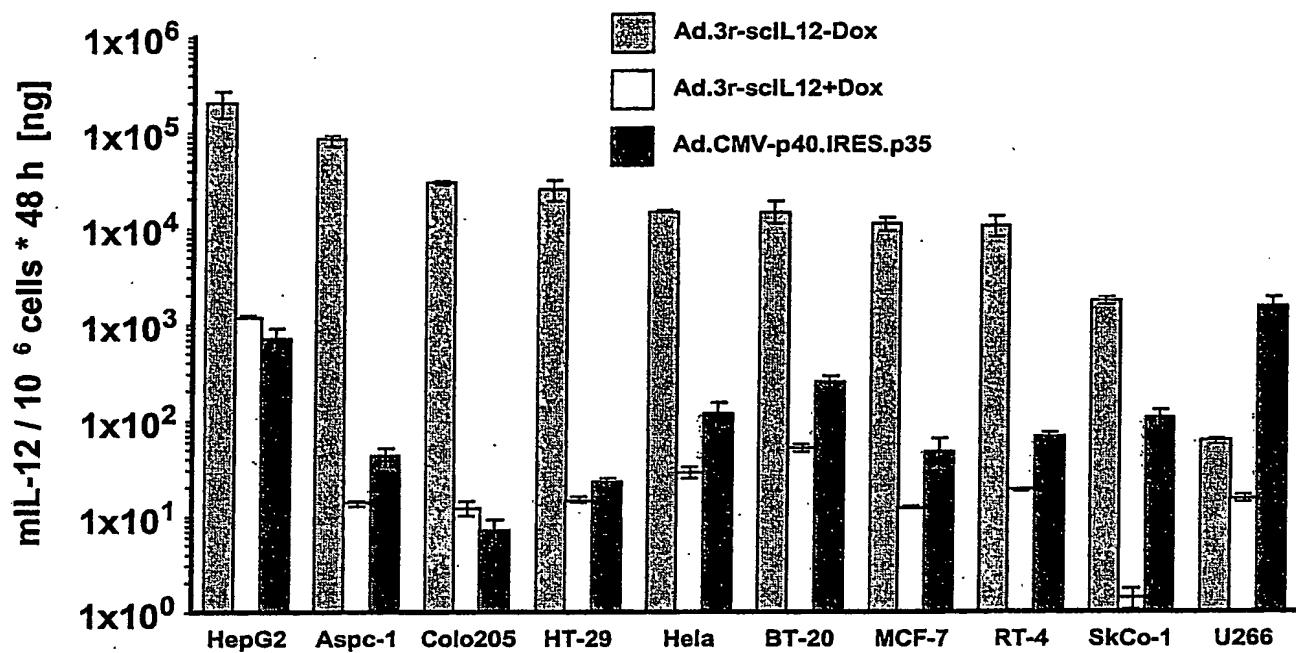
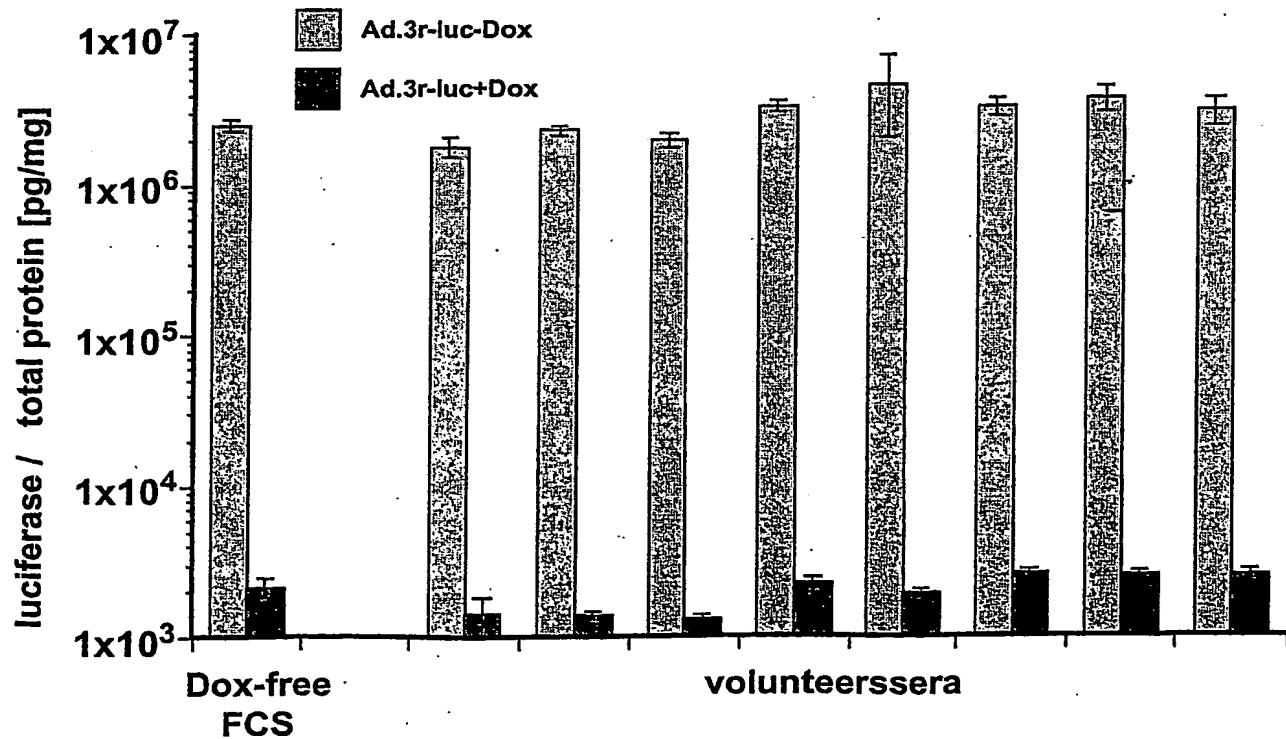


Figure13



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.